

50X1-HUM

Page Denied

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А. Н. ВАХА

ВИТАМИННЫЕ РЕСУРСЫ
И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

СБОРНИК ТРЕТИЙ

МЕТОДЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ



ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА - 1955

ПРЕДИСЛОВИЕ

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР

В. Н. Букин

Весьма большое количество опубликованных методов определения витаминов и различных модификаций этих методов делает затруднительным выбор наиболее подходящих из них при постановке новых исследований. В связи с этим к нам поступают многочисленные запросы о рекомендации тех или иных методик, и многие научные работники, приезжающие с периферии, знакомятся с ними в нашей лаборатории. Особенно это касается микробиологических методов определения и тех оригинальных химических методов, которые разработаны в лаборатории витаминов Института биохимии им. А. И. Баха АН СССР, но не получили еще широкого распространения.

Указанное обстоятельство побудило нас обобщить имеющийся опыт лабораторных исследований и дать подробное описание методов, каждый из которых потребовал критического обоснования и проверки, а в ряде случаев специальной разработки.

К числу последних относятся химические методы определения витаминов D, B_2 , B_{12} и фолиевой кислоты, микробиологические методы определения витамина B_6 и никотиновой кислоты (выполнены в лаборатории проф. М. И. Мейселя в Институте микробиологии АН СССР) и биологический метод определения активности витамина, обладающих Р-витаминным действием. К числу подобных работ должна быть отнесена и работа по подбору специфического адсорбента отечественной марки для витамина B_1 , что важно для широкого внедрения химического метода определения этого витамина.

Хроматографический метод анализа на бумаге является, как известно, весьма перспективным, однако в применении к витаминам он сравнительно мало разработан. Одним из ограничивающих обстоятельств здесь является относительно малая доступность препаратов чистых витаминов и особенно их

ПРЕДИСЛОВИЕ

ОТВЕТСТВЕННЫЙ РЕДАКТОР
В. Н. Вукин

Весьма большое количество опубликованных методов определения витаминов и различных модификаций этих методов делает затруднительным выбор наиболее подходящих из них при постановке новых исследований. В связи с этим к нам поступают многочисленные запросы о рекомендации тех или иных методик, и многие научные работники, приезжающие с периферии, знакомятся с нами в нашей лаборатории. Особенно это касается микробиологических методов определения и тех оригинальных химических методов, которые разработаны в лаборатории витаминов Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, но не получили еще широкого распространения.

Указанное обстоятельство побудило нас обобщить накопившийся опыт лабораторных исследований и дать подробное описание методов, каждый из которых потребовал критического обоснования и проверки, а в ряде случаев специальной разработки.

К числу последних относятся химические методы определения витаминов β , B_2 , B_{12} и фолиевой кислоты, микробиологические методы определения витамина B_6 и пантотеновой кислоты (выполнены в лаборатории проф. М. И. Мейселя в Институте микробиологии АН СССР) и биологический метод определения активности веществ, обладающих Р-витаминным действием. К числу подобных работ должна быть отнесена и работа по подбору специфичного адсорбента отечественной марки для витамина B_1 , что важно для широкого внедрения химического метода определения этого витамина.

Хроматографический метод анализа на бумаге является, как известно, весьма перспективным, однако в применении к витаминам он сравнительно мало разработан. Одним из ограничивающих обстоятельств здесь является относительно малая доступность препаратов чистых витаминов и особенно их

производных, применяющихся в качестве «свидетелей» или «метчиков».

В данном сборнике помещается заново разработанный метод хроматографического разделения на бумаге провитамина и витаминов группы D и метод разделения свободного рибофлавина, его мононуклеотида и динуклеотида.

В приложении к сборнику дается краткое описание уже известных методов определения аскорбиновой кислоты и каротина в том виде, в каком они применяются в нашей лаборатории.

Мы полагаем, что издание сборника облегчит задачу подбора и использования необходимыми методами и тем самым будет способствовать дальнейшему развитию отечественных биологических исследований.

Заранее приносим благодарность всем лицам, которые своими критическими замечаниями по поводу рекомендемых методик способствовали бы их дальнейшему усовершенствованию.

Доктор биологических наук В. Н. Букин

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

И. Н. ГАРКИНА

ХИМИЧЕСКИЙ И СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА А

Основные методы определения витамина А — спектроскопический и химический; последний основан главным образом на цветной реакции витамина А с треххлористой сурьмой и реже с глинеридихлоргидрином. Реакция с гиперцианидхлоргидрином при большой стабильности получаемого цветного продукта значительно менее чувствительна, и в силу этого применение ее не получило широкого распространения.

Среди методов определения витаминов — определение витамина А является наиболее сложным. Биологические методы недостаточно чувствительны и требуют большого количества животных для получения статистически достоверных результатов. Применение же более доступных — химических и спектроскопических — методов связано с рядом затруднений, обусловленных присутствием в испытуемых материалах сопутствующих примесей, искаляющих результаты определений.

Bo избежание этих затруднений в нашей лаборатории применяется сочетание химического и спектроскопического методов определения витамина А, параллельно с контрольной проверкой результатов определения посредством биологических опытов.

На основании накопленного материала ниже приведено описание хода анализа витамина А в природных продуктах в том виде, в каком он применяется в нашей лаборатории. Предварительно в кратком виде излагаются основные свойства самого витамина А и отдельных его форм, показывающие сложность анализа и условность существующих методов определения этого витамина.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВИТАМИНА А

Под витамином А следует подразумевать не одно вещество, а группу веществ, обладающих общностью основной структуры

кристаллического препарата, но возможно, что и эта активность обусловливается наличием примеси непрореагированного витамина A₁.

Таблица 2
Сравнительная характеристика ацетатов витаминов A₁, A₂ и A₃

Химическая формула витаминов	Максимум экстинции $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ в этиловом спирте	
	Ацетат витаминов A ₁ и A ₂	Продукты реакции с SbCl_3
 Витамин A ₁	при $328 \text{ m}\mu = 1700$	при $620 \text{ m}\mu = 5000$
 Витамин A ₂	при $351 \text{ m}\mu = 1460$ при $287 \text{ m}\mu = 820$	при $623 \text{ m}\mu = 4100$
 Витамин A ₃	при $351 \text{ m}\mu = 2540$ при $371 \text{ m}\mu = 3680$ при $392 \text{ m}\mu = 3200$	при $620 \text{ m}\mu = 5500$

* me означает вводу метильную группу — CH₃.

Стандарты витамина A₁

В 1934 г. на Международной конференции по стандартизации витаминов было принято решение измерять активность известной в то время лишь одной формы витамина A по чистому β-каротину, причем 1 международная единица была приравнена биологической активности 0,6 гаммы β-каротина.

В 1949 г., в связи с получением чистого синтетического ацетата витамина A₁, устойчивого при хранении, в качестве стандарта был принят растворенный в хлопковом масле ацетат этого витамина с содержанием его 3,44 мг в 1 г масла.

Одна международная единица была приравнена активности 3,44 гаммы ацетата или 0,3 гаммы витамина A₁ алкоголя. Этот стандарт и служит для измерения активности всех форм витамина A.

β-Каротин был оставлен в качестве стандарта лишь для измерения активности провитаминов A.

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА A

При всем разнообразии форм витамина A, присутствующих в природных источниках, все же возможно суммарное определение активности этого витамина, близко отвечающее данным биологического испытания.

Спектрофотометрический метод определения витамина A применяется главным образом для анализа высокоактивных жиров, концентратов и неомыляемых фракций малоактивных жиров. При этом коэффициенты экстинкции при 328 м μ являются надежными показателями содержания витамина A только тогда, когда в исследуемом материале нет примесей, обладающих близким спектром поглощения. С целью устранения из отсчетов дополнительного поглощения, даваемого примесями, Мортон и Штаббс [6] разработали метод внесения поправок, позволяющий получать при спектрофотометрических измерениях величины, хорошо совпадающие с результатами биологических испытаний.

Простой и быстрый метод вычисления поправки Мортона и Штаббса, принятый фармакопейными комитетами ряда стран, опубликован Корр [7].

Исправленная величина абсорбции витамина A = $7A_{325\text{m}\mu} - 4,375A_{334\text{m}\mu} - 2,625A_{360\text{m}\mu}$, где A обозначает величину абсорбции витамина A при соответствующей длине волны, указанной с правой стороны.

Для упрощения расчетов эту формулу удобнее применять в следующем преобразованном виде.

Исправленная величина абсорбции = $7(A_{325\text{m}\mu} - A_{310\text{m}\mu}) + 4,375(A_{340\text{m}\mu} - A_{334\text{m}\mu})$.

Исправленная величина абсорбции = 0,498.

При внесении поправки спектрофотометрический метод дает результаты наиболее близко, по сравнению с другими методами, совпадающие с результатами биологических испытаний.

природных источниках находится в основном в виде эфиров, являющихся значительно более устойчивыми, чем свободный витамин A₁. Синтетические эфиры витамина A также устойчивы, как и природные эфиры витамина A₁. При хроматографии на колонке витамина A₁ сильнее удерживается влажной окисью алюминия (5% воды), чем неовитамин A.

Основным источником неовитамина являются также жиры рыбьей печени, из неомыляемой фракции которых он и был выделен [1]. Содержание его в этих жирах доходит до 35% от общего количества витамина A.

Неовитамин A был выделен в чистом виде путем омыления его фенилизобензойного эфира (темпер. пл. 94—96°).

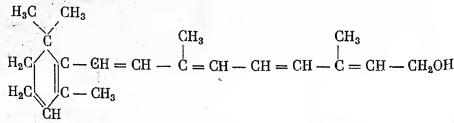
Антрахинон неовитамина A окрашен в красный цвет, в то время как такое же производное витамина A₁ имеет желтую окраску. Инфракрасный спектр неовитамина A почти идентичен спектру витамина A₁.

Витамин A₁ быстро реагирует с малеиновым ангидридом с образованием продукта, который не дает цветной реакции с треххлористой сурьмой, тогда как неовитамин A реагирует с этим соединением гораздо медленнее, что позволяет определять таким путем неовитамин A в присутствии витамина A₁.

Витамины A₂ и A₃

За последние годы все чаще встречаются работы, указывающие на содержание в жирах печени пресноводных рыб веществ, обладающих активностью витамина A и обозначаемых как витамин A₂ и витамин A₃ [2, 3, 4, 5].

Витамин A₂



По строению витамин A₂ отличается от витамина A₁ только наличием еще одной двойной связи в β-иононовом кольце.

Биологическая по ростовому эффекту на крысах активность витамина A₂ составляет 40—50% от активности витамина A₁.

Химический метод определения витамина A

по физико-химическим свойствам витамин A₂ также отличается от витамина A₁. Особенно велики различия по абсорбционному

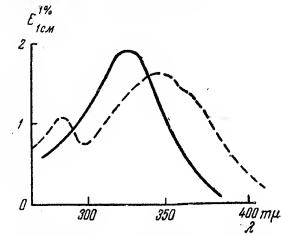
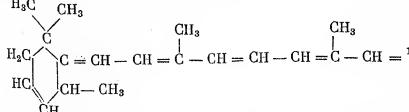


Рис. 1. Абсорбционный спектр витамина A₁ (—) и витамина A₂ (---) в этиловом спирте

спектру как самого витамина A₁, так и продукта его реакции с SbCl₃, что показано на рис. 1 и в табл. 2.

Витамин A₃



Витамин A₃, называемый также ангидровитамином A₁, образуется при обработке витамина A₁ хлористым водородом в этиловом спирте и имеет полосы поглощения 351, 371 и 392 мк (табл. 2). Этот же углеводород находится в малых количествах в рыбьих жирах и всегда присутствует как побочный продукт при получении синтетических препаратов витамина A₁.

При изучении структуры этого соединения вначале предполагали, что витамин A₃ имеет бициклическое строение, но в настоящее время считают, что в его формуле имеется один цикл и шесть двойных связей (табл. 2). Биологическая активность витамина A₃ составляет около 17 000 инт. ед. на 1 г

¹ Характер конечной группы молекулы витамина A₃ окончательно не установлен.

Абсорбционные кривые провитамина D₂ и D₃ представлены на рис. 1, витаминов D₂ и D₃ — на рис. 2.

Цветной продукт реакции, образующийся при взаимодействии хлороформенного раствора треххлористой сурьмы и

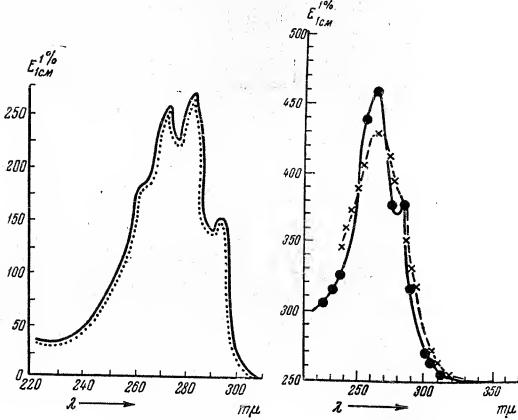


Рис. 1. Абсорбционный спектр 7-дегидрохолестерина (—) и эргостерина (···) в этиловом спирте

раствора витаминов D₂ и D₃ в хлороформе, имеет максимум абсорбции при 500 м μ , его коэффициент экстинкции $E_1^{1\%} = 1800$.

Более подробно свойства провитаминов и витаминов D₂ и D₃ суммированы в табл. 2, а их производных — в табл. 3.

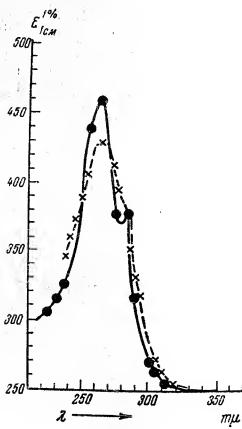


Рис. 2. Абсорбционный спектр витамина D₂ (x—x—x—x) и витамина D₃ (●—●—●—) в гексане

Таблица 2

Свойства провитаминов и витаминов D₂ и D₃

Показатели	Эргостерин	Витамин D ₂	7-Дегидрохолестерин	Витамин D ₃
Эмпирическая формула	C ₂₈ H ₄₄ OH	C ₂₈ H ₄₄ OH	C ₂₇ H ₄₄ OH	C ₂₇ H ₄₄ OH
Молекулярный вес . . .	396,6	396,6	384,6	384,6
Температура плавления	153°	145—117°	142—143,5°	82—84°
Температура перегонки при 0,4 мм остаточного давления	250°	250°	—	—
Максимум абсорбции в м μ (в спирте)	281	281,5	281	264,5
$E_1^{1\%}$ при максимальной абсорбции	268	453,9±7,5	280	473,2±7,8
$E_1^{1\%}$ при 500 м μ продукта реакции с SbCl ₃ . . .	36	1800	36	1800
Оптическая активность $[\alpha]_D$:				
в эфире	— 94,0°	+ 91,2°	—	—
в хлороформе . . .	-125,2°	+ 52,25°	-113,6°	—
в бензоле	-125,8°	+ 87,5°	—	—
в спирте	- 93,0°	+106,2°	—	+83,3°
в ацетоне	- 92,0°	+ 83,5°	—	
Интернациональные единицы в 1 мг	—	40 000	—	40 000
Антирактическое действие	Нет	Очень сильно	Нет	Очень сильно
Биологическая активность	»	Млекопитающие	»	Млекопитающие
Действие дигитонина . .	Осаждается	Нет	Осаждается	Нет

от веса желтка количества 96%-ного этилового спирта, смесь взвешивают и неомыляемую фракцию экстрагируют серным эфиром в 3 приема: 1-й раз — 5-кратным количеством и 2 раза — 2,5-кратным количеством по отношению к весу желтка. В указанном примере к 22 г желтка приливают 44 мл воды, 33 мл 60%-ного раствора KOH, общий объем 99 мл. После омыления добавляют 198 мл воды и 44 мл спирта. Экстракцию витамина А производят эфирем, причем первый раз берут 110 мл эфира и 2 раза — по 55 мл.

Эфириные вытяжки соединяют, отмывают водой от щелочи, сушат в течение 30 мин. безводным Na_2SO_4 и после фильтрования эфир отгоняют под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяют в 5—10 мл хлороформа.

Хлороформенный раствор используют для колориметрирования. Вычисляют содержание витамина А в 1 г желтка или в 1 г яйца.

Определение витамина А в сыворотке крови

10 мл сыворотки крови помещают в колбу Эрленмейера на 50—100 мл и приливают 1 мл 60%-ного раствора KOH. Колбу закрывают резиновой пробкой, снабженной воздушным ходильником (стеклянной трубкой, имеющей 60—100 см в длину с внутренним диаметром, равным 3—5 мм), и проводят гидролиз пакции водяной бани в течение 30 минут.

После охлаждения массу переносят в делительную воронку и приливают 5—10 мл этилового спирта. Витамин А экстрагируют эфирем (4 раза по 25 мл эфира), дальнейший анализ ведут так же, как описано при определении витамина А в молоке.

Л и т е р а т у р а

1. Ковесоп С. Д. а. Вахтер J. G. Neovitamin A.—J. Am. Chem. Soc., 69, 136 (1947).
2. Ледерер Е. А. и Розонова В. А. Исследования по витамины А рыбных жирах I. Ненормальная реакция Carr u. Price.—Биохимия, 2, 203 (1937).
3. Lederer E., Rosonova V., Gilliam A. a. Neilbronn J. Differences in the chromogenic properties of freshwater and marine fish liver oils.—Nature, 140, 233 (1937).
4. Jensen J. L., Shantz E. M., Embree N. D., Gawley J. D. a. Harris P. L. The biological activity of vitamin A₂.—J. Biol. chem., 149, 473 (1943).
5. Gilliam A. E., Neilbronn J. M., Jones W. E. a. Lederer E. On the occurrence and constitution of the 693 m μ chromo-

mogen (vitamin A₂) of fish liver oils.—Biochem. J., 32, № 2, 405 (1938).

6. Morton R. A. a. Stubbs A. L. Spectrophotometric determination of vitamin A in liver oils. Correction for irrelevant absorption.—Biochem. J., 42, 195 (1948).
7. Korg Z. Rapid method of calculation Morton — Stubbs correction on determination of vitamin A.—Chem. Analyst, 42, № 1, 15 (1953).
8. Мургай Т. К. а. Campbell J. A. A comparison of physical and chemical methods with biological assay of vitamin A.—J. Pharmacy a. Pharmacol., 5, 596—607 (1953).
9. Лугунов Л. Л., Букин В. Н., Березин И. Т. и Плазоровская М. К. Гигрократический метод производства витаминных рыбьих жиров.—Витаминные ресурсы рыбной промышленности. Изд. АН СССР, Москва, 1951.

изгиб к оси абсцисс и идет почти параллельно с ней, то этим отрезком кривой пользоваться нельзя ввиду нарушения соответствия закону Ламберта — Бера.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А

Определение витамина А в исследуемом растворе производят так же, как описано в разделе «Калибрование колориметра». Количество раствора, взятого на определение, подбирают в зависимости от концентрации витамина А в анализируемой навеске с таким расчетом, чтобы пропускание (D) укладывалось в пределах делений шкалы 20—45, что достигается при условии содержания 10—70 инт. ед. витамина А во взятой для колориметрирования пробе (0,5 мл).

Расчет содержания витамина А

Содержание витамина А рассчитывают по калибровочной кривой.

По показаниям гальванометра (D) находят соответствующие значения экстинкции (E) по таблице, прилагаемой в инструкции к пользованию колориметром, или рассчитывают по формуле $E = \lg \frac{1}{D}$. По калибровочной кривой находят соответствующее найденной экстинкции (E) содержание витамина А в международных единицах. Найденное количество витамина А умножают на 2 и тем самым находят содержание витамина А в 1 мл приготовленного для колориметрирования раствора, затем находят содержание витамина во всем объеме исследуемого раствора, соответствующее содержанию витамина А во взятой навеске, и, наконец, рассчитывают его содержание в 1 г исследуемого образца.

Пример расчета. Неомыляемую часть навески жира или другого вещества, взятой в количестве 0,5 г, растворяли в 5 мл хлороформа. Для реакции с треххлористой сурьмой взято 0,5 мл этого раствора и 4,5 мл раствора треххлористой сурьмы. Найденная величина $D = 37$, а соответствующая ей величина $E = 0,2$. По калибровочной кривой для экстинкции 0,2 количество витамина А составляет 25 инт. ед.

$25 \times 2 = 50$ инт. ед. витамина А в 1 мл исследуемого раствора.

$50 \times 5 = 250$ инт. ед. витамина А во всем объеме исследуемого раствора или во взятой навеске.

$250 \times 2 = 500$ инт. ед. витамина А в 1 г анализируемого образца.

По вышеизложенному методу проводится определение содержания витамина А в концентратах, рыбьих жирах, печени и других богатых витамином А природных продуктах. При меньшем содержании витамина А применяются некоторые специальные приемы, о которых говорится ниже.

Определение витамина А в молоке

Омыление молока проводят спиртовой или водной щелочью. При омылении спиртовой щелочью к 100 мл молока приливают 50 мл свежеприготовленного водного раствора 60%-ного раствора KOH и 150 мл этилового спирта. Содержимое тщательно перемешивают и оставляют на 3 часа при комнатной температуре.

Для омыления водной щелочью к 100 мл молока приливают 10 мл 60%-ного раствора KOH, колбу наполняют углекислотой при перемешивании, затем закрывают пробкой и ставят в термостат на двое суток при температуре 25—37°. В течение процесса омыления содержимое 2—3 раза перемешивают осторожным вращением колбы. По окончании омыления приливают 20 мл этилового спирта. Для извлечения витамина А как в первом случае при омылении спиртовой щелочью, так и при омылении водной щелочью смесь экстрагируют эфиром 3 раза по 50 мл эфира каждый раз. Эфирные экстракты соединяют, отмывают водой от щелочи, для чего берут 3 раза по 40 мл воды, и сушат над безводным сернокислым натрием. Из экстракта эфир отгоняют досуха и сухой остаток растворяют в 2 мл хлороформа. Полученный хлороформенный раствор употребляют для колориметрирования.

Определение витамина А в желтке яйца

Яйцо взвешивают, отделяют желток в тарированную колбу на 200 мл и определяют его вес. В колбу с желтком добавляют двойное от веса желтка количество воды и 60%-ный водный раствор KOH в соотношении 1,5 : 1 к весу желтка.

Пример. Бес желтка 22 г, требуется воды 44 и 33 мл 60%-ного раствора KOH.

Колбу соединяют с обратным холодильником и содержимое омыливают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. при периодическом пропускании тока CO₂.

Омыленный раствор после охлаждения помещают в делительную воронку, приливают двойной объем воды и двойное

3. Хлороформ.
4. Серный эфир.
5. Этиловый спирт.
6. Хлористый ацетил или свежеперегнанный уксусный ангидрид.
7. Бензойл.
8. Маленовский ангидрид (х. ч.).
9. Дигитонин*.
10. Бальзам с CO_2 или ИСИ в концентрации 1 : 1 и мрамор для получения CO_2 .
11. Смазка для притертых краев, нерастворимая в органических растворителях (крахмал в глицерине).

IV. Подготовка реактивов и приготовление растворов

1. 50%-ный раствор KOH (50 г KOH растворяют в 50 мл дистиллированной воды).

2. Этиловый спирт для освобождения от алdehydeов оставляют на ночь под твердым химически чистым NaOH (10 г на 1 л спирта) и затем перегоняют или перегоняют без настанивания. Самая типичная очистка спирта достигается перегонкой спирта, декантированного с осадка окиси серебра, образовавшегося при втяхивании 1 л спирта с 3 г KOH и 1,5 г азотистого серебра.

3. Серный эфир. Продажный эфир отмывают от перекисей щелочным перманганатом калия. К 1 л эфира в делительной воронке прибавляют 10 мл 40%-ного раствора NaOH или KOH и 190 мл 4%-ного раствора перманганата калия. Эфир несколько раз втяхивают. После отстаивания водный раствор окиси перманганата (зеленого цвета) сливают и эфир обрабатывают еще несколько раз, если проба указывает на присутствие перекисей. Этую пробу производят следующим образом: к 20 мл эфира прибавляют 5 мл смеси, состоящей из равных объемов 50%-ного раствора КJ и 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина, и втяхивают. Образование красной окраски указывает на присутствие перекисей. После освобождения от перекисей эфир отмыают от щелочи водой до потери реакции с фенолфталеином, сушат обезвоженным сернокислым натрием и перегоняют.

* Производится на экспериментальном заводе Харьковского научно-исследовательского химико-фармацевтического института.

4. Хлороформ для удаления ИСИ, образующейся при его хранении в результате гидролиза, и спирта, добавляемого обычно для стабилизации, промывают 2–3 раза водой (объем на объем), сушат безводным Na_2SO_4 , втяхивают с пятнико-сью фосфора и перегоняют, отбирая фракцию при 61–62°.

5. Ацетил хлористый перегоняют при 5°, хранят в склянке темного стекла с хорошо притертой пробкой. Если пользуются уксусным ангидридом, то при перегонке отбирают фракцию в пределах 140–142°.

6. Раствор треххлористой сурьмы. На каждые 23 г SbCl_3 берут 100 мл хлороформа. Треххлористую сурьму, содержащую влагу, промывают хлороформом до прекращения образования мутного раствора гидрата окиси сурьмы. Промытый раствор сушат в вакуум-конденсаторе над концентрированной H_2SO_4 в течение 1–2 суток и затем берут на весы для приготовления раствора.

При использовании загрязненной треххлористой сурьмой ее предварительно перед растворением перегоняют следующим образом. В ретortу на 500 мл со стеклянной притертой пробкой и отводной трубкой длиной 18–20 см, с внутренним диаметром у выходного конца, равным 12 мм, помещают 60–100 г SbCl_3 и 2–3 стеклянные бусники для равномерности кипения с целью предотвращения перегрева жидкости.

Эту операцию можно также вести в колбе Бюрга с короткой и широкой отводной трубкой. Реторту с содержимым устанавливают на электроплитку или колбогреватель и включают обогрев. При 73° треххлористая сурьма расплывается, а при 219° жидкость закипает. Для равномерного кипения и предупреждения закупорки конца отводной трубы реторту дополнительно подогревают газовой горелкой (пламя горелки передвигают вдоль реторты непрерывно до конца перегонки). Когда на дне реторты останется немного жидкости, перегонку прекращают.

Первую фракцию отгоняют, представляющую собой окрашенную в желтый цвет жидкость — солиную кислоту с небольшим количеством сурьмы, отбрасывают. Чистую сурьму собирают в сухие предварительно тарированные пробирки. Пробирки временно закрывают корковыми пробками, и, по окончании перегонки, взвешивают, а затем запечатывают.

Реторту отмывают соляной кислотой (1 : 1).

7. Бензойл для освобождения от тиофена постепенно вымачиваются при температуре минус 1–2°, кристаллы отфильтровываются, переносят в стеклянную банку, сушат над CaCl_2 и

Из табл. 7 и составленного на ее основе рис. 3 можно видеть, что средние отклонения результатов химического определения от биологического составляют 12,7% в сторону превышения и 12,6% в сторону занижения.

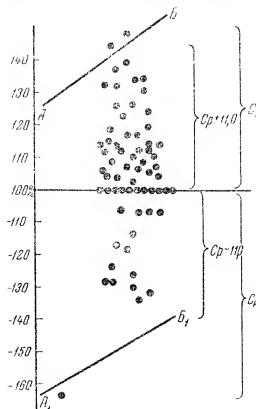


Рис. 3. Сопоставление химического и биологического методов определения витамина D

Каждая точка показывает отклонение (%) результатов испытания отдельного образца химическим методом от соответствующего биологического испытания. За точку приема показания биологической определения. Точки обозначают: выше линии 100% — данные химического метода превышают данные биологических испытаний. Ниже линии 100% — отклонение данные химического метода более чем показания биологических испытаний. Линии AB и A_1B_1 отсекают реаль отклонениям данных химических испытаний

Если же отбросить далеко выходящие отклонения в трех опытах (жир дельфинина, сазана и судака), то эти отклонения соответственно составят $+41,5\%$ и $-41,0\%$.

Учитывая, что точность самого биологического определения составляет $\pm 15\%$, указанное соответствие между химическим и биологическим методами определения витамина D следует признать вполне удовлетворительным.

Описание метода

Необходимая посуда, оборудование, реактивы, их подготовка и обработка

1. Использа

(из расчета проведения двух параллельных анализов).

1. Колбы Эрленмейера на 100 мл — 4 шт., на 200 мл — 2 шт.

2. Стеклянные трубки длиной 400 см с внутренним диаметром 3,5 мм — 2 шт. (служат в качестве воздушных холодильников при омылении жиров).

3. Колбы Вюрца из Кливезена на 400—150 мл — 1 шт.

4. Холодильники Либиха среднего размера — 1 шт.

5. Колба Буицена на 250 мл — 1 шт. (приемник к холодильнику Либиха).

6. Цилиндры церные из 40, 25, 50 и 100 мл — по 1 шт.

7. Стаканчики химические из 30, 50, 100 мл — по 2 шт.

8. Делительные воронки из 200 мл — 2 шт.

9. Хроматографические колонки 15 см длиной с внутренним диаметром 4 см — 2 шт.

10. Колбы Буицена на 250 мл — 2 шт. (приемники к хроматографическим колонкам).

11. Иробрики — 2 шт. (для помешивания в колбах Буицена в качестве приемников элютов с хроматографическими колонками).

12. Пипетки из 10, 2 и 1 мл — по 1 шт.

13. Склянки Тыщенко для промывания и сушки CO_2 — 2 шт.

14. Вакуумный экстрактор — 1 шт.

15. Склянка из 250—500 мл из темного стекла с хорошо притертой пробкой и притертым колпаком для хранения раствора треххлористой сурьмы — 1 шт.

II. Оборудование

1. Фотоэлектрический колориметр марки ФЭК-М с спектральным светофильтром в области пропускания 480—520 мкм и максимумом пропускания при 500 мкм. Можно пользоваться также визуальным колориметром Нуффриха.

2. Водяная баня.

3. Электрическая плитка.

4. Термометр из 100—150°.

5. Пемза, фарфор или стеклянные бусы для равномерности кинесии.

6. Секундомер или песочные часы из 4 мин.

7. Шприцы из 10 и 5 мл, к ним присоединяются изогнутые для отбора растворов треххлористой сурьмы и хлороформа.

III. Реактивы

1. Витамин D_2 — кристаллически чистый (для калибрования электрофотоколориметра).

2. Едкое кали (х. ч.).

Таблица 7 (продолжение)

Наименование исследованных яиц и концентратов	Район или место изготовления образцов	Содержание витамина D, инт. ед.		Отклонение от биологических испытаний и %
		по химическому методу	по биологическим испытаниям	
Печени трески	Мурманск	75	108	-30,56
Печени кита, гидролизованной с растительным маслом	Институт биохимии АН СССР	300	290	+ 9,0
Кита зубатого	Дальнеевосточный край	275	256	+ 7,42
Из багрицы	Мурманск	0	0	0,0
Из консервов печени лососевых	Институт биохимии АН СССР	300	250	+16,67
Из консервов печени трески	То же	405	305	+32,78
Из внутренностей селедки	Астрахань	60	45	+33,33
То же, другой образец	То же	100	88	±18,68
Судака из внутренностей	» »	80	54	+48,14
То же, другой образец	» »	250	216	+15,74
Ленца из внутренностей	» »	150	183	-18,00
То же, другой образец	» »	360	286	+25,87
Дельфина поджожный бассейн	Азовово Черноморский	0	43	0,0
То же, другой образец	То же	100	105	-7,4
Печени полярной трески	Мурманск	80	68	+17,6
То же, другой образец	То же	85	61	+39,0
Кита финифтала поджожный	ВНИРО	435	397	+22
II. Облученные яйцы				
Тюлени поджожный	Азовово-Черноморский бассейн	4317	3510	+10,40
Морского скунса из внутренностей	Мурманск	4533	4075	+11,24
Севрюги туловищной	Волго-Каспийский бассейн	5000	4750	+ 5,26
Печени бактийской трески	Липецкая Латвийской ССР	7 800	7 110	+ 9,72
Севрюги из молок	Еното-Каспийский бассейн	4 694	4 075	+15,20
Моллюсков	Институт биохимии АН СССР	11 200	10 000	+10,74
Кита поджожный	Дальнеевосточный край	3 737	3 600	+ 3,80

Химический метод определения витамина D

33

Таблица 7 (окончание)

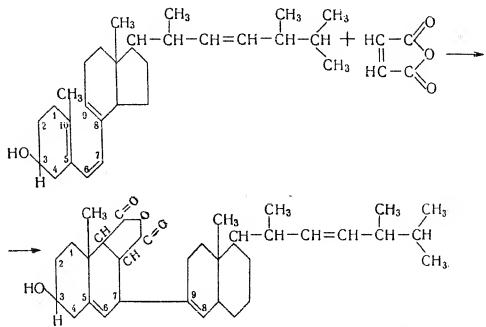
Наименование исследованных яиц и концентратов	Район или место изготовления образцов	Содержание витамина D, инт. ед.		Отклонение от биологических испытаний и %
		по химическому методу	по биологическим испытаниям	
Печени акулы	Мурманск	3 300	3 100	+ 6,45
Ленца из внутренностей	Астрахань	5 680	5 500	+ 3,3
То же, другой образец	То же	3 200	3 500	- 5,7
Из отходов частичных	Морськомбиннат	9 275	1 000	+ 7,25
Кита поджожный	То же	5 775	5 750	+ 0,3
Кита поджожного после гидролиза с печенью кита	» »	4 140	4 000	+16,0
Образец № 5	» »	10 120	9 600	+12,4
Образец № 8	» »	11 070	10 200	+ 8,5
Печени балтийской трески	Липецкая Латвийской ССР	7 110	6 850	+ 3,8
Трески после гидролиза с печенью антарктического кита	Морськомбиннат	18 000	13 000	+38,4
Трески	То же	1 650	2 000	-15,5
Кита	» »	1 140	1 000	+14,0
Технический	» »	2 500	2 000	+25,0
III. Образцы облученного яростеррипа				
Спиртовый концентрат витамина D ₂	Витаминный цех фабрики «Марат»	139 000	160 000	-31,1
То же	То же	160 000	200 000	+20,2
» »	» »	180 000	160 000	+12,2
» »	» »	50 000	53 000	- 5,7
» »	» »	200 000	270 000	-26,0
» »	» »	131 000	125 000	+ 5,0
» »	» »	240 000	230 000	+ 4,3
» »	» »	71 500	54 400	+31,4
» »	» »	80 000	93 200	-14,2
» »	» »	675 000	590 000	+14,4
» »	» »	70 500	54 400	+29,84
» »	» »	13 500	10 000	+25,93

количество маленнового ангидрида при 40—45° в течение 20 мин. сохраняется на 98—99%.

Проверка возможности конденсации тахистерина в растворах облученного эргостерина показала, что при данных условиях за 20 мин. тахистерин конденсируется полностью.

Наличие метильной группы при углеродном атоме с двойной связью отличает тахистерин от витамина D₂ и обусловливает легкую подвижность его сопряженных двойных связей, благодаря чему тахистерин реагирует с маленновым ангидридом быстрее, чем витамин D и другие фотодериваты.

Присоединение маленнового ангидрида к тахистерину идет по двум углеродным атомам системы сопряженных двойных связей (в положениях 7, 8) с образованием новой двойной связи (в положении 5,6), а именно:



Образовавшийся продукт устойчив к окислению ввиду отсутствия сопряженных двойных связей и по этой же причине не вступает в реакцию с треххлористой сурьмой.

Так как оценка любого химического метода определения витамина D может быть дана лишь на основе сопоставления с результатами биологических испытаний, в помещенных ниже табл. 7 и рис. 3 мы приводим накопившиеся в нашей лаборатории результаты сравнительного анализа многих образцов.

Таблица 7

Сравнение химического и биологического методов
определения витамина D

(Содержание витамина в 1 г и в 1 мг спиртовых концентратов)

Наименование исследованных яиц и концентратов	Район или место изготовления образцов	Содержание витамина D ₂ инт. сд.		Отклонение от биологических испытаний в %
		по химическому методу	по биологическим испытаниям	
I. Не облученные яйца				
Тюлени подковий . . .	Волго-Каспийский бассейн	20	0	0,0
То же	То же	0	0	0,0
Дельфина подковий . . .	Азово-Черноморский бассейн	40	103	-63,0
То же годовика	То же	25	0	0,0
Печени акулы	Дальневосточный край	75	80	-6,25
Печени акулы катран . . .	Азово-Черноморский бассейн	25	0	0,0
Кита подковий, витаминизированный китовым печенью	Дальневосточный край	500	700	-28,57
Печени мигрия	То же	22	0	0
Печени ската (морского кота)	Азово-Черноморский бассейн	0	0	0,0
Из внутренностей сазана	Волго-Каспийский бассейн	470	325	+44,16
Морского окуня из внутренности	Мурманск	100	140	-28,57
Ленса из внутренности	Волго-Каспийский бассейн	250	325	-23,08
Севрюги туловищной из срезков	Волго-Каспийский бассейн	0	0	0,0
Печени бытийской трески	Лиепая Латвийской ССР	145	216	-32,87
То же, другой образец	То же	100	76	+31,60
Севрюги из молок	Волго-Каспийский бассейн	25	0	0,0

активности. Данные обоих методов хорошо согласуются с результатами биологических испытаний. Различие методов, состоит лишь в применении разных адсорбентов и их обработке, а также в деталях проведения отдельных операций.

ПРИНЦИП МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА D И НЕКОТОРЫЕ ЕГО УТОЧНЕНИЯ

Метод основан на осаждении стеринов дигитонином, удалении из раствора таихистерина путем его конденсации с малениновым ангидридом и отделении витамина A на бентоните. В подготовленных для анализа очищенных растворах определение витамина D производят по реакции с треххлористой сурьмой в хлорформе, пользуясь в качестве стандарта для сравнения растворами чистого кристаллического кальциферола.

Описываемый метод отличается от опубликованного ранее [1] более подробным изложением отдельных операций, особенно стадии хроматографической очистки, являющейся наиболее ответственной частью анализа. Дополнительно помещены результаты проверки устойчивости витамина D₂ в процессе конденсации таихистерина с малениновым ангидридом. Для проведения этих опытов применяли кристаллический химически чистый витамин D₂ и свежеперегнанный малениновый ангидрид. Все операции проводили только в атмосфере CO₂.

В табл. 4 приведены данные по устойчивости витамина D₂ при конденсации в зависимости от длительности реакции при температуре конденсации, равной 40—45°, и количестве маленинового ангидрида, взятом в 7-кратном избытке по отношению к количеству витамина, исходя из молекулярных соотношений (в 1,86 раза больше против взятого количества витамина D₂).

Таблица 4

Устойчивость витамина D₂ при конденсации в зависимости от длительности реакции

Длительность конденсации в минутах	Содержание витамина D ₂		
	E	инт. ед.	%
Контроль (витамин D ₂ до конденсации)	0,31	6300	100
20	0,30	6160	97,7
30	0,28	5700	93,3
40	0,25	5150	83,3
50	0,25	5150	83,3

Как видно из табл. 4, конденсация в продолжение 30 мин. при указанных выше условиях витамина D₂ не затрагивает. В табл. 5 приведены результаты по устойчивости витамина D₂ при воздействии в течение 20 мин. при 40—45° различных количеств маленинового ангидрида.

Таблица 5

Устойчивость витамина D₂ в зависимости от количества взятого маленинового ангидрида

Соотношение витамина D и маленинового ангидрида	Содержание витамина D ₂		
	E	инт. ед.	%
Контроль 1:0	0,235	4800	100
1:7	0,230	4700	97,7
1:14	0,230	4700	97,7
1:28	0,230	4700	97,7

Из табл. 5 видно, что даже 28-кратный избыток маленинового ангидрида не снижает количества присутствующего витамина D₂.

В табл. 6 представлено влияние температуры на устойчивость витамина D₂ при конденсации. Было взято 7-кратное количество маленинового ангидрида при длительности реакции конденсации, равной 20 минутам.

Таблица 6

Устойчивость витамина D₂ при конденсации в зависимости от температуры

Температура °C	Содержание витамина D ₂		
	E	инт. ед.	%
Контроль (витамин D ₂ до конденсации)	0,44	8100	100
19—20	0,43	7900	97,5
40—45	0,43	7900	97,5
50—55	0,42	7700	95,4
55—60	0,42	7700	95,4

Таким образом, на основании проведенных опытов установлено, что витамин D₂ при воздействии 7—14-кратного

отгонка избытка хлороформа нельзя допускать нагревания выше 35—40°.

6. Колориметрирование. Колориметрический метод определения витамина D основан на измерении довольно стойкой желтовато-розовой окраски, образующейся при взаимодействии растворов витамина D и треххлористой сурьмы (1:6). Величина поглощения света окрашенным раствором при 500 м μ является функцией концентрации витамина D в исследуемом растворе. Для колориметрического определения витамина D требуются следующие условия:

а) Колориметр должен давать хорошую воспроизводимость результатов измерения и пропорциональность отсчетов концентраций витамина.

б) Светофильтры должны быть с достаточно узкой полосой пропускания, желательно в пределах 480—520 м μ с максимумом пропускания при 500 м μ .

в) Гальванометр должен обладать чувствительностью порядка 10⁻⁸—10⁻⁹ А и сравнительно коротким временем установления равновесия стрелки или зайчика (10—20 секунд).

г) Набор кювет должен быть из бесцветного стекла одинакового диаметра (точно проверенного).

д) Электроколориметр предварительно калибруют по растворам чистого витамина D₂ известной концентрации.

7. Калибрование колориметра. 10—20 мг кристаллического химически чистого витамина D₂ помещают в тарированном небольшой блоке и высушивают в вакуум-экскаваторе над концентрированной H₂SO₄ при 40° до постоянного веса.

Затем берут навеску высущенного кристаллического витамина D₂ с таким расчетом, чтобы в 1 мл этилового спирта (предварительно перегнанного с NaOH) содержалось 4000—8000 инт. ед. витамина D₂, т. с. 0,1—0,2 мг.

П р и м е р. Допустим, что навеска высущенного витамина D₂ равна 10 мг. 1 мг витамина D₂ содержит 40 000 инт. ед., 10 мг витамина D₂ содержат 400 000 инт. ед. При растворении 400 000 инт. ед. в 50 мл спирта в 1 мл спиртового раствора содержится 8000 инт. ед. витамина D₂.

Спиртовый раствор витамина хранят в холодильнике в склянке с притертой пробкой. Для составления калибровочной кривой берут в колбу Вюрца пищеткой, градуированной не до конца, 1 мл указанного раствора витамина и туда же приливают 10 мл хлороформа. Смесь хлороформа со спиртом отгоняют в вакууме досуха. Сухой остаток растворяют в точном

количестве хлороформа, в данном примере в 4 мл. В 1 мл полученного хлороформенного раствора при этом содержится 2000 инт. ед. витамина D₂. К 1 мл хлороформенного раствора витамина D₂ приливают 3 капли хлористого ацетила или свежеперегнаного уксусного ангидрида. Туда же быстро пищеткой, прикрепленной к пищетке, приливают 6 мл раствора треххлористой сурьмы. По истечении 4 минут окрашившийся в желтовато-розовый цвет продукт реакции колориметрируют и записывают величину экстинкции или процент поглощения, соответствующую 2000 инт. ед. витамина D₂. Затем находят значение экстинкции для 1000, 500, 250 и 100 инт. ед. витамина.

После колориметрирования указанных растворов витамина D₂ строят калибровочную кривую, откладывая по оси ординат величины экстинкции или процента поглощения, а по оси абсцисс соответствующие им концентрации витамина D₂ в инт. ед.

Калибровочная кривая должна представлять собой прямую линию, так как реакция витамина D₂ с треххлористой сурьмой подчиняется закону ЛамBERTA — БЭРА.

Обычно калибровочная кривая представляет прямую линию только для определенного участка, затем при большем содержании витамина она идет почти параллельно оси абсцисс. При расчетах результатов колориметрирования следует пользоваться только тем участком калибровочной кривой, который строго отвечает закону ЛамBERTA — БЭРА.

На рис. 4 представлена типичная калибровочная кривая, полученная при работе с колориметром ФАК М.

ВЫЧИСЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Подсчет содержания витамина D в исследуемом растворе производят по калибровочной кривой. По показаниям гальванометра находят значение экстинкции исследуемого раствора

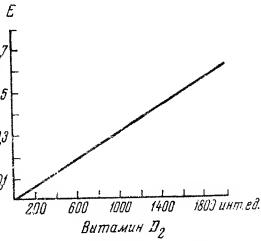


Рис. 4. Калибровочная кривая для кристаллического витамина D₂, растворенного в хлороформе

углекислотой, закрывают плотно корковой пробкой, помещают в водяную баню при температуре 40—45° и в течение 20 мин., не вынимая из бани колбы, круговым движением врачают ее с целью перемешивания реакционной смеси.

4. Осаждение стеринов. По окончании конденсации бензол отгоняют при разрежении, к остатку прибавляют 10 мл этилового спирта, приливают 1 мл воды, кладут кусочек пемзы и содержимое нагревают на водяной бане до кипения. Добавление воды создает лучшие условия для осаждения стеринов и одновременно устраняет избыток непрореагировавшего малеинового ангидрида. Затем приливают горячий 0,5%-ный или 1%-ный спиртовый раствор дигитонина в 10-кратном избытке от предполагаемого веса стеринов. При содержании стеринов до 5 мг в 1 г рыбьего жира приливают 5—10 мл раствора дигитонина, что достаточно для полного их осаждения. Фильтрат после отделения дигитонида проверяют на полноту осаждения стеринов (на этой стадии удобно прервать работу до следующего дня; в этом случае раствор после добавления дигитонина, не отфильтровав осадка, оставляют в холодильнике до следующего дня, закрыв колбу пробкой).

После 30—40-минутного или более продолжительного стояния осадок комплекса стерин-дигитонида отфильтровывают на микроворонке с водоструйным насосом через маленький бумажный плотный фильтр.

Осадок дигитонида тщательно промывают на фильтре горячим спиртом, затем эфиром и высушивают в течение 40—50 мин. при 100°. Легко отделяемый от бумаги дигитонид взвешивают.

Количество стеринов вычисляют умножением веса дигитонида на коэффициент — для холестерина 0,2431, для эргостерина 0,2492. Коэффициент 0,2431 рассчитывают по формуле, выведенной из стереохимической реакции холестерина с дигитонином:

$$\frac{386,4}{386,4 + 1202} = 0,2431;$$

386,4 — молекулярный вес холестерина, 1202 — молекулярный вес дигитонина.

В фильтрат после осаждения стеринов приливают один объем воды, и витамин D экстрагируют эфиром 4 раза порциями по 25 мл. Эфирные экстракты промывают водой 3 раза по 40 мл и сушат над безводным Na_2SO_4 . Сухой эфирный экстракт отфильтровывают в колбу Вюрца. Сернокислый

натрий промывают эфиром 2 раза по 10—15 мл, эфир сливают через фильтр в ту же колбу и отгоняют с кусочком пемзы при слабом разрежении. К сухому остатку, с целью вытеснения следов влаги и спирта, прибавляют 5 мл хлороформа и отгоняют досуха. При этом следы влаги и спирта отходят вместе с хлороформом в виде азеотропной смеси. После этого остаток в колбе быстро заливают 2 мл сухого хлороформа.

5. Хроматография. Зарядка колонки. Отвешивают по 2 г сухого обработанного бентонита, безводного сернокислого натрия, растирают в ступице и заливают 10 мл хлороформа. Полученную взвесь выливают в колонку, в узкой части которой помешана вата. Бентонит, приставший к внутренней поверхности колонки, смывают хлороформом. После оседания бентонита липкий хлороформ сливают насквозь колонки, оставляя над бентонитом его слой высотой около 1 см. На бентонит насыпают около 0,5 г мелкого сернокислого натрия и затем выливают из колбы Вюрца исследуемый раствор. Колбу ополаскивают 10 мл хлороформа, выливают его в колонку сразу же после прохождения через нее исследуемого раствора, не допуская перерыва. Бесцветный элюят собирают в колбу, а появляющийся затем элюят, окрашенный в желтый цвет, собирают отдельно в пробирку (его обычно бывает 3—4 мл). После этого колонку промывают 3 раза по 10 мл хлороформа, для ускорения промывки ведут с отсасыванием.

Полученные начальные и конечные бесцветные элюаты собирают в одну и ту же колбу. По окончании отмычки столбик бентонита выталкивают из колонки проволокой и выбрасывают. Колонку заряжают вторично таким же образом, как и первый раз. Собранный при работе с первой колонкой окрашенный элюат пропускают точно так же через вторую колонку бесцветными элюатами сливают в ту же колбу, куда сливать элюаты от первой колонки. Окрашенный элюат также собирают отдельно в пробирку, колонку промывают хлороформом три раза по 10 мл и бентонит выбрасывают. Собранный окрашенный элюат пропускают через третью свежезаряженную колонку и его пропаривают реакций с SbCl_3 на присутствие витамина D. В случае отрицательной реакции третья колонка не обрабатывается, при положительной реакции происходит элюцию и отмытие.

Собранные бесцветные элюаты концентрируют в вакуме с кусочком пемзы при температуре не выше 35—40° до объема 5—15 мл в зависимости от предполагаемого содержания витамина D. При перегреве витамина D в хлороформном растворе окисляется с образованием желтой окраски, поэтому при

растворимость в 95%-ном спирте хорошая, при добавлении к спирту воды растворимость понижается; легко растворяется в смеси спирта с хлороформом. Кристаллизуется из 85%-ного спирта. Нерастворим в бензоле, ксилоле, серном эфире.

Регенерация растворителя. Отгон смеси спирта с хлороформом (см. пункт 4) используется непосредственно для обработки новой партии наперстянки (пункт 6).

При осветлении экстракта согласно пункту 4 проворяют перед добавлением угла правильности соотношения количества спирта и хлороформа по удельному весу, который должен лежать в пределах 0,883—0,917. Если необходимо, к смеси добавляют недостающее количество хлороформа.

Для быстрого определения содержания дигитонина в сырье и определения его пригодности к переработке применяют следующий метод. Навеску (20 г) листьев наперстянки, предварительно экстрагированных водой и высушенных при указанных выше условиях, заливают 10-кратным количеством спирта и оставляют на ночь. Листья отделяют от экстракта фильтрованием; фильтрат струится в 10 раз под вакуумом, к нему добавляют в горячем виде 0,5%-ный спиртовой раствор ergostерина или холестерина (15 мл). Смесь нагревают до 70° и выдерживают при комнатной температуре в течение 20—30 минут. Образующийся осадок дигитонина отфильтровывают, промывают спиртом, затем серным эфиром, высушивают при 100° в течение 15—20 минут и взвешивают. Умножая полученный вес на 0,75, определяют тримерное содержание дигитонина в навеске, а при умножении этого результата на 50 получают содержание дигитонина в 1 кг исходного сырья.

10. Бентонит, не набухающий в воде, для лучшей фильтруемости заливают 2 л. HCl (на 400 г бентонита требуется 1 л 2 н. HCl), доводят до кипения, охлаждают и отмывают водой от HCl декантацией. Высушивают при 120—130° и хранят в экскаторе над безводным CaCl₂. Если пользуются бентонитом, набухающим в воде, то его промывают 2—3 раза хлороформом, 1—2 раза эфиром, высушивают в вакуумэкскаторе, затем в сушильном шкафу при 120—130°.

11. Смазка для крацов. 9 г растворимого крахмала, предварительно растертого в ступице до тонкого порошка, сусpendingируют в 22 г глицерина и нагревают при непрерывном помешивании стеклянной палочкой точно до 140°. После 30-минутного стояния смазку сливают (декантируют) в чистый химический стакан и ставят в холодильник для достижения густой консистенции.

I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D В ОБЛУЧЕННЫХ И НЕОБЛУЧЕННЫХ ЖИРАХ РЫБ И МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1. О м л е н и е. Необлученные рыбы жиры, в зависимости от содержания витамина D, берут на анализ в количестве от 1 до 10 г, но так, чтобы в навеске содержалось не менее 200 мкт. ед. витамина.

Облученные рыбы жиры, содержащие в 1 г не менее 2000 мкт. ед. витамина D, берут в количестве 0,5—1 г, а жиры с содержанием от 5000 мкт. ед. и выше — в количестве 0,25—0,5 г. К навеске жира до 1 г приливают 20 мл этилового спирта и 4 мл 50%-ного водного раствора KOH (х.ч.) и помещают в водяную баню при 85—90° с обратным воздушным холодильником на 45—50 минут. При навеске жира в 5—10 г количество спирта и щелочки берут 2—3 раза больше, чем при работе с навеской жира до 1 г.

2. Экстракция. По окончании омыления, о чём судят по просветлению мыльного раствора, содержащемое колбы переносят в делительную воронку, добавляют 1 объем воды (используя, пишите образуется стойкая эмульсия) и экстрагируют 4 раза по 25 мл серным эфиром. Эфирные экстракты соединяют, отмывают водой от щелочи 3 раза, причем каждый раз берут по 40 мл воды, и сушат над сернокислым патрием в течение 30 минут. Эфир сливают через фильтр в колбу Вюрца или Кляйзена, оставшийся сернокислый патрий промывают 2 раза эфиром, каждый раз по 10 мл; эфир сливают в ту же колбу и отгоняют при слабом разогревании. Возможные следы влаги вытесняют пропариванием в колбочку (после отгонки эфира) 5—7 мл бензола и отгонкой бензола в вакууме; сухой остаток быстро заливают 10 мл бензола.

3. Конденсация тахистерина. К бензольному раствору неомываемых веществ приливают 0,7%-ный раствор маленинового ангидрида, который берут в избытке, а именно — при ожидаемой активности до 5000 мкт. ед. берут 0,5 мл, при 5000—20 000 мкт. ед. — 0,8 мл и при активности 20 000—40 000 мкт. ед. — 1—2 мл.

При использовании сухим препаратом маленинового ангидрида вместо 0,5 мл 0,7%-ного его раствора берут навеску 5 mg и, соответственно, вместо 0,8 мл — 10 mg и вместо 2,0 мл — 15 mg ангидрида. Конденсацию проводят в колбе Эрленмейера (5—100 мл). После пребывания в бензольному раствору неомываемых веществ маленинового ангидрида колбу заполняют

перегибают. Если нет условий для вымораживания, 1 л бензола встуживают в делительной воронке с 10 мл концентрированной H_2SO_4 , промывают от кислоты раствором соды до прекращения окрашивания лакмуса в красный цвет, отмывают водой до нейтральной реакции, сушат свежепрокаленным $CaCl_2$ и перегоняют.

8. Малениновый ангидрид растворяют в сухом, очищенном от тиофена бензоле. Раствор (0,7%) не стоки (в присутствии следов влаги выпадает нерастворимый осадок малениновой кислоты), поэтому его готовят в количестве, необходимом для 2–3 дней работы. При анализе лучше пользоваться тут же взятыми павесками сухого ангидрида. Малениновый ангидрид применяют химически чистый. Можно применять реактив ч. д. а. (ОСТ № 8007/929), выпускаемый Харьковским заводом, при условии, если он не увлажнен. Малениновый ангидрид, выпускавшийся этим же заводом под маркой «чистый», непрерогден без очистки из-за присутствия примесей. Его очищают перегонкой в реторте, описание размеров которой приведено при описании способа очистки сурмы. Перегонку ведут небольшими порциями с тем, чтобы применять в анализах свежеперегнанный или недолго хранившийся ангидрид. В реторту помещают 18 г маленинового ангидрида и 3,25 г пятиокиси фосфора. Реторту с содержимым нагревают на электрической плите или колбонагревателе. При 50° малениновый ангидрид плавится, а при 202° при атмосферном давлении перегоняется. Пятиокись фосфора плавится только при 536° , поэтому она находится в жидком малениновом ангидриде в виде твердых частиц. Для равномерного кипения и предупреждения закупорки отверстия конца отводной трубы реторту дополнительным подогревом газовой горелкой, как и при перегонке сурмы (см. выше), не допускается перегрева, который обнаруживается по появлению газообразных продуктов разложения маленинового ангидрида. Собирают малениновый ангидрид в небольшую широкую баночку; сразу после окончания перегонки его разрывают стеклянной палочкой и закрывают притертой пробкой.

9. Дигитонин — раствор в 95%-ном этиловом спирте — 1%-ный, если пользуются дигитонином из семян наперстянки производства Харьковского НИХФИ, и 0,5%-ный, если готовят препарат по нашему способу из отходов (полученных от Химфармзавода) листьев наперстянки после их водной экстракции для приготовления препаратов, используемых при сердечных заболеваниях. По осаждающему действию на стерину указанные препараты дигитонина совершенно идентичны. Ввиду того что метод получения дигитонина из семян наперстянки

не описан, приводим предложенный нами способ получения этого препарата из листьев.

а. Листья делятся отгнивают и сушат при температуре не выше 30° (не на солнце).

б. Экстрагируют водой и высушенные листья заливают шестикратным количеством 95–96%-ного этилового спирта и настаивают при комнатной температуре в течение 2 дней. Экстракт сливают, листья отбрасывают.

в. К спиртовому экстракту для его осветления добавляют 10–15% по объему эфирформа и 3% активированного древесного порошкообразного угля. После 20–30-минутного перемешивания угля с фильтруют и отбрасывают. При хранении в экстракте заметной зеленоватой окраски операцию осветления повторяют в 1% склонного угла.

г. Фильтрат гущают под вакуумом при температуре не выше 30 – 35° до появления белых хлопьев дигитонина (при мерно в 10 раз) и ставят для кристаллизации в холодильник на 12 часов. Маточный раствор еще раз сгущают и также ставят для кристаллизации.

П р и м е ч а н и е. Спирт (темп. кип. 78°) и хлороформ (темпер. кип. $61,4^\circ$) образуют взаимную смесь, кипятку при $55,7^\circ$; в колюне весу 7% спирта и 93% хлороформа, таким образом хлороформ остается в первых дугах.

д. Осадок сиропа ангидрида отфильтровывают и растворяют в малом количестве 85%-ного спирта нагретого до 60 – 70° и ставят на ход. Белые кристаллы дигитонина отфильтровывают, промывают водой и сушат на водяной спиртом, затем серным эфиром и высушивают в экскаваторе. Маточный раствор после перекристаллизации еще раз сгущают и ставят для кристаллизации.

е. Основное качество готового продукта состоит в его способности количественно осаждать стерин, что проверяется следующим образом. I. павеске (10 mg) чистого сухого холестерина или эргостерина растворяют в 5 ml 95%-ного спирта, добавляют 20 ml 0,5%-ного спиртового раствора дигитонина (100 mg), нагревают на водяной бане в течение 5 мин., охлаждают и осадок отфильтровывают на микроворонке под вакуумом. Осадок плавят по промыванию спиртом, затем эфиром и высушивают в сушильном шкафу при 100° в течение 15–20 минут. После этого осадок дигитонина изменяют; умножают вес осадка на 0,244, получают вес исходного холестерина, а при умножении на 0,2492 — вес исходного эргостерина.

Дополнительные показатели качества готового продукта таковы: температура плавления около 230° (теория 235°),

Пример журнальной записи (продолжение)

Даты начала и окончания опыта	Исследуемое вещество, добавленное в диете	Предполагаемая активность (нит. ед. в 1 мл)	№ краски	Вес в г			Процент химической пропитки пробки в пробирке	Среднее прохоров в единицах взвешивания
				в начале опыта	через 7 дней	посл. заборах		
7.VII—22.VII	Стандартный раствор витамина D	8	40	40	42	44	10	9,4
				41	44	48	5	
				38	40	43	14	
				39	41	44	11	
				42	43	46	6	
				43	45	47	4,5	
				39	46	49	11	
				40	42	50	15,5	
То же	То же	12	41	41	43	48	5	6
				42	44	49	5	
				39	40	47	5	
				40	40	45	6	
				38	39	44	5	
				43	45	49	5	
				42	43	50	5	
				39	41	45	12	
То же	Растительное масло	—	25	40	42	45	20	18,6
				42	44	46	15	
				41	45	49	16	
				39	42	47	18	
				43	48	50	24	
То же	Без добавок	—	27	44	44	47	10	15
				38	41	44	12,5	
				38	40	44	13	
				41	44	49	19	
				M-33	44	49	19	
				M-34	40	43	47	

Биологическая методика в определении D-витаминной активности 81

В нашем случае при испытании дозы, соответствующей содержанию 50 нит. ед. в 1 мл или 0,8 нит. ед. в 0,016 мл, получаем на графике (см. стр. 78) соответственно 1,07 нит. ед. Следовательно, в 1 мл жира заключается не 50 нит. ед., как предполагали, а

$$0,016 : 1,07 = 66,3 \text{ нит. ед.}$$

$$1 = x$$

При испытании дозы, соответствующей содержанию 150 нит. ед. в 1 мл или 0,3 нит. ед. в 0,0054 мл, получаем на графике соответственно 0,43 нит. ед. Следовательно, в 1 мл жира заключается не 150 нит. ед., как предполагалось, а

$$0,0054 : 0,43 = 66,8$$

$$1 = x$$

Берем среднее арифметическое и о.р.утгнем

$$\frac{66,8 + 73,4}{2} = 73,4 \text{ нит. ед.}$$

В 1 мл испытуемого вещества содержится 73 нит. ед. витамина D и 80 нит. ед. при пересчете на 1 г, исходя из среднего удельного веса рыбных жиров = 0,92.

Данным методом было проведено испытание 65 различных препаратов, содержащих витамин D (см. статью Н. Н. Гаркани и В. И. Букнина в этом сборнике).

Метод биологического испытания витамина D — «проба на четкую землю» точек и прост и не требует дорогостоящих рентгеновских установок.

Л и т е р а т у р а

1. В. И. Букни и Н. Н. Ерофеева. Биологический метод определения и результаты испытания рыбных жиров и других продуктов морского промысла из витамина D. — Сб. I. Витаминные ресурсы рыбной промышленности. Изд. АН ССР, стр. 250—265. Москва, 1951.
2. Р. С. Смиллианска. К методике получения экспериментального рахита.—Сб. 2. Витамины в теории и практике, т. III, вып. 1, 1941.
3. Shue G. M., Friedmann L. a. Tolle C. D. An improvement in the vitamin D line test.—Analyst. Chem., 24, №11, 1841—43, 1952.

Обработка результатов опыта

Обработку результатов опыта можно проводить по методу графической интерполяции (см. график).

На оси ординат откладывают среднее арифметическое промеров хрящевой прослойки для каждой группы крыс; на оси

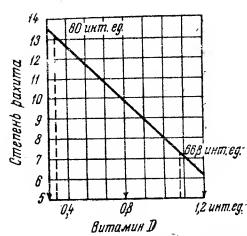


График для расчета содержания витамина D по методу графической интерполяции.

На оси ординат — степень рахита в единицах шкалы окулярмикрометра; на оси абсцисс — содержание витамина D в международных единицах

абсцисс — дозы стандартного раствора витамина D. Кривая для стандартного раствора изображена сплошной линией. Среднюю величину промеров для групп, получавших испытуемое вещество, откладывают на оси ординат.

Из точки пересечения со стандартной кривой опускают перпендикуляр на ось абсцисс (пунктирная линия). Точка пересечения с осью абсцисс показывает, какому количеству интернациональных единиц соответствует дневная доза испытуемого препарата. На основе этого высчитывают количество интернациональных единиц на 1 мл или на 1 г испытуемого вещества.

Приводим пример журнальной записи опыта по биологическому определению D-витаминной активности печеночного жира акулы (таблица).

Пример журнальной записи

Даты начала и окончания опыта	Используемое вещественное обогащение в дисте	Продолжительность опыта (час., в 1 мес.)	Вес в г			Среднее значение весовых шкалы опыта, зарегистрированное	
			№ прибора	в начале опыта	через 7 дней		
7.VII— 22.VII	Нечешуйчатый жир акулы (г. Владивосток)	150	33	35	43	45	15
			34	40	42	44	10
			35	41	44	52	25
			36	40	45	50	10
			37	42	46	59	10,5
			38	39	42	46	10
			39	42	45	48	13,5
			40	39	40	46	10
							13.
То же	То же	50	41	40	42	47	4
			42	38	40	43	6
			43	41	43	47	8,5
			44	39	41	46	14
			45	42	44	47	12
			46	42	45	48	5
			47	40	42	45	4,5
			48	41	44	48	5
То же	Стандартный раствор витамина D	4	1	43	43	48	20
			2	42	45	46	9
			3	39	42	44	15
			4	40	43	45	5
			5	41	44	48	15
			6	40	41	47	15,5
			7	39	40	46	18
			8	38	41	47	10
							13,4

Группа отрицательного контроля имеет две подгруппы. Животные одной из них не получают никаких добавок к хитогеной диете. Животные второй подгруппы получают рафинированное подсолнечное масло в количестве 0,1 мл или 0,05 мл (в зависимости от избранного количества, даваемого всем животным), являющееся растворителем для используемых образцов и стандартного раствора. Три группы положительного контроля получают соответственно 0,4; 0,8 и 1,2 шт. ед. витамина D в день в виде кристаллического кальциферола, растворенного в подсолнечном масле. Две опытные группы (а если позволяет количество животных, то три группы) получают используемый образец, разбавленный подсолнечным маслом, соответственно предполагаемой активности, но так, чтобы одно разведение было выше, а другое ниже активности, указанной на этикетке пробы. Флаконы с разведенными препаратами и стандартными растворами следует хранить в темном, прохладном месте.

В состав двух групп отрицательного контроля входит по 5 животных, в состав остальных - по 10 животных. Крысятам получают добавки к диете (кальциферол или используемые вещества) регулируя специально проградуированной пипеткой (на 0,05 или 0,1 мл) с резиновой грушей на конце; добавки даются ежедневно.

Длительность каждого из наших опытов была равна 15 дням. Взвешивание животных проводили в начале опыта, через 7 дней и перед забоем. Животные, не показавшие привеса или прибавившие более 20 г, из опыта исключались. Остальных животных убивали (серым эфиром).

Исследование состояния подопытных животных

Для исследования берут большие берновые кости задних конечностей. После очистки от мышц кости помешают в 4%-ный раствор формалина на 24 часа. После фиксации их хорошо промывают в воде (10–15 мин.), затем рассекают продольно тонким глазным скальпелем. Срез кости погружают в 1%-ный раствор азотнокислого серебра и выставляют на свет яркой электрограммы до появления на поверхности разреза серой окраски (соль серебра, связанная в неустойчивое соединение с фосфорионильными солями кальция кости, восстанавливается до металлического серебра, давшего темную окраску).

После этого срезы быстро промывают водой и помешают в 4%-ный раствор гипохлорита на 10–15 мин. для закрепления

окраски. Затем вновь промывают водой и переносят в 4%-ный раствор формалина или 75%-ный спирт. В таком виде срезы могут долго сохраняться.

На поверхности разреза кости в области зоны эпифизарного остеогенеза на темном фоне костной ткани выделяется светлая хрищевая полоса («чешта», отсюда название метода — «проба на чешту»).

Степень ракита определяют по ширине этой прослойки хрища, измеряемой с помощью окуляриметра под бинокулярной лупой. Нормой является ширина хрищевой прослойки, равная 300–360 микронам, большая величина свидетельствует о наличии ракита.

Если количество исследуемых животных не великo и нет необходимости сохранять остатки материала, то обработку костей можно значительно сократить. Отгремаризованную кость сразу же рассекают продольно, затем промывают в дистиллированной воде (10 мин.), погружают в раствор азотнокислого серебра и выстилают на свет электроламмы до появления ясно заметной окраски. В таком виде кости немедленно просматривают (не вынимая их из раствора азотнокислого серебра) под бинокулярной лупой и производят промер шириной хрищевой прослойки.

Шу, Фридман и Толь [3] большое внимание уделяют промывке среза кости перед погружением в азотнокислое серебро. Для более четкого равномерного окрашивания они рекомендуют следующую обработку.

Срез кости помешают в отдельную для каждого животного чашечку со смесью из 3 частей эфира и 1 части ацетона на 5 минут. После этого кости просушивают и для удобства дальнейшей обработки укрепляют на пластинку, покрытую слоем резинового клея. Далее пластинку (с прикрепленными к ней срезами костей данной группы крыс) погружают в 95%-ный этиловый спирт на 10 мин., затем на 10 мин. в ацетон. После этого пластинку промывают не менее 30 мин. дистиллированной водой, сменяя ее через 4, 10 и 20 мин. После промывания пластинку погружают в 2%-ный раствор азотнокислого серебра. Для длительного сохранения срезов авторы рекомендуют тщательную промывку после обработки азотнокислым серебром и последующее высушивание кости.

Наблюдаемое иногда не вполне равномерное окрашивание среза кости объясняется тем, что жир мозгового вещества кости просачивается на поверхность среза и мешает окрашиванию. Обработка ацетоном и эфиром предотвращает это явление.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

Н. Н. ЕРОФЕЕВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
Д-ВИТАМИНОЙ АКТИВНОСТИ («ПРОБА НА ЧЕРТУ»)

Определение биологической (антирахитической) активности витамина D₂ проводят на молодых белых крысах. Удобнее всего проводить определение не лечебным, а профилактическим методом, дающим ответ уже через 2 недели опыта [1].

В основу этого метода положено определение того минимального количества испытуемого препарата, которое при ежедневном введении крысам, содержащимся на рахитогенной диете, предохраняет их в среднем на 80% от заболевания рахитом. Параллельно исследуют действие стандартного раствора кристаллического витамина D и на основании сопоставления результатов испытания делают расчет активности опытного образца, выражая ее в интернациональных единицах.

Так как опытные животные должны быть максимально однородны по возрасту, весу, условиям содержания до опыта и по содержанию и рациону маточного поголовья, необходимо при лаборатории иметь собственный питомник.

СОДЕРЖАНИЕ КРЫС В ПИТОМНИКЕ

Рацион маточного поголовья обычный, обеспечивающий полноценность диеты и хорошую плодовитость самок. Рацион состоит из крупы, овса, отрубей, миса, молока, хлеба и овощей. Во избежание накопления витамина D у молодняка из рациона исключается линька рыбий жир.

Для большей однородности материала излишок приплоды смыте 6—7 штук уничтожают; при рождении менее 5 штук приплод идет для пополнения маточного поголовья и в опыт не включается. Молодняк, достигший веса 40—50 г, поступает в опыт.

Биологический метод определения D-витаминной активности 75

Формирование и содержание опытных групп

Обычно для опыта составляют 6—8 групп. В каждую опытную группу, по возможности, включают по одному крысенку из данного помета для того, чтобы группы были наиболее однородны. Каждого крысенка взвешивают и метят.

Метки удобно делать путем покраски раствором инкриной кислоты, условно приняв покраску головы за № 1, спины — за № 2, у хвоста — № 4, правой передней лапы — № 32, левой передней лапы — № 8, правой задней лапы — № 64, левой задней лапы — № 16. Комбинация указанных открасок частей тела крысенка позволяет пометить большое число животных. Например, № 6 состоит из откраски спины и около хвоста (2 + 4), № 9 — из откраски левой передней лапы и головы (8 + 1) и т. п.

Все группы переводят на рахитогенную диету следующего состава:

Инченная мука (30%-ного или 72%-ного помола)	90 частей
Сухие пивные или чекарские дрожжи	5 *
Очищенный мед	2,9 части
Поваренная соль	2 *
Лимонно-лимонное масло	0,1 *

Иногда при замедленном росте добавляют зеленые проростки овса в небольшом количестве.

Составные части смешиваются и измельчаются лепешками. Каждый крысенок получает 20—25 г лепешек в сутки. Прокипяченная вода дается в неограниченном количестве.

В некоторых лабораториях используют другую диету. Р. С. Смилянская [2] рекомендовала диету следующего состава:

	в %
Мясо сушеное	40
Сахар	15
Очищенный мед	4
Поваренная соль	4
Инченная мука	70

Животных каждой группы содержат в отдельных клетках в помещениях без прямого солнечного света, что исключает возможность синтеза витамина D в коже подопытных животных.

Таблица 9

Обнаружение витаминов D₂ и D₃ в подсаженной фазе 87%-ного метилового спирта на бумаге, пропитанной 3%-ным раствором парафина

Наименование вещества, нанесенного на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см		<i>R_f</i>	Длина пятна в см
	в мл	в г	T°	Приложенное к бумаге в часах	фаска	пятна		
Витамин D ₂ (свидетель)	0,005	20	24	16	При стекании раствора растительного масла	24	0,44	5
Масляный раствор витамина D ₂	0,002	20	24	16	длина линии фронта	25	0,46	4
Витамин D ₃ (свидетель)	0,05	20	24	16	длина линии фронта	47,5	0,88	5
Жир китя	0,08	20	24	16		54	0,80	5
* трески	0,06	20	24	16		44	0,81	4

Следует подчеркнуть, что для витаминов D₂ и D₃ величины *R_f* могут изменяться в зависимости от природы растворителей, качества бумаги, ее пропитывания и других условий, но всегда имеется возможность, применив свидетели, эти условия использовать таким образом, чтобы достигнуть разделения витаминов D₂ и D₃.

ВЫВОДЫ

Проведены исследования по изысканию методов хроматографического разделения на бумаге провитаминов и витаминов D, при этом установлено следующее:

1. Провитамины и витамины D весьма близки по своему поведению при хроматографическом разделении на бумаге; этим следует объяснить крайне недостаточное количество работ по их разделению этим методом.

2. Путем подбора должного сорта отечественной бумаги (например, бумага № 2 Ленинградской бумажной фабрики), соответствующей ее обработке (промывание, пропитывание) и применением определенных растворителей (диоксан, метиловый и этиловый спирты) удалось доказать возможность:

Разделение провитаминов и витаминов D

- а) разделения провитаминов D (эргостерина, 7-дегидрохолестерина в присутствии холестерина);
- б) разделения витаминов D₂ и D₃;
- в) количественного определения витаминов D₂ и D₃ после их разделения на бумаге.

3. Метод бумажной хроматографии на бумаге провитаминов и витаминов D открывает возможность его применения в широкой области исследований, касающихся характера их биосинтеза, а также их превращений в процессах обмена в норме и патологии и в целом ряде исследований в области стеринов.

В заключение считаю своим долгом привести благодарность проф. В. И. Букнику за ценные советы и указания при выполнении данной работы и проф. В. И. Вендузу за предоставление синтетического препарата 7-дегидрохолестерина и препарата витамина D₃.

ЛITERATURA

1. Zaffaroni A., Wigton R. B. a. Keutmann E. N. The application of paper partition chromatography to steroid analysis.—Journ. of biol. chem., 177, 109 (1949).
2. Mc Mahon J. M., Davis R. B. a. Kalnitsky G. Identification of sterols in filter paper and their separation by paper partition chromatography.—Proceedings of the Soc. for exp. biology a. medicine, 75, 799 (1950).
3. Нойман М. В., Левковский В. И. и Луконников А. Ф. Хроматографическое разделение динитрофенилгидразинов на ацетилированной бумаге.—ДАН, 81, № 5, 841 (1951).
4. Гаркина И. Н. и Букни В. И. Химический метод определения витамина D в рыбных жирах.—Витаминные ресурсы и их использование. Сб. 1. ЦДА АН ССР, 1951.

количественного определения такая бумага не пригодна, так как при экстракции стерина извлекается и касторовое масло, которое мешает реакции с $SbCl_3$.

IV. Разделение витаминов D_2 и D_3

Разделения витаминов D_2 и D_3 можно достичь только в тщательно очищенных экстрактах, свободных от стерина и витамина A. В указанных ниже подвижных фазах витамин D_3 во всех случаях продвигается по бумаге дальше по фронту, чем витамин D_2 , с разницей в величине R_f в 72%-ном метиловом спирте на 36%, в 72%-ном диоксане на 48% и в 78%-ном метиловом спирте на 50% (табл. 7, 8 и 9).

Таблица 7

Обнаружение витамина D_3 в яичре печени кита и трески

Наименование вещества, нанесенного на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см		R_f	Длина пятна в см	
	в мл	в мг	т°	протекционный слой в масках	фазы	пятна			
Витамин D_2 (свидетель)	0,005	20	32	16	При стекании растворителя длины фронта	14,5	0,27	4,5	
Витамин D_3 (свидетель)	0,05	20	32	16	на линии фронта	41	0,76	10	
Жир кита	0,08	20	32	16	на линии фронта	40	0,75	8	
* трески	0,06	20	32	16	53,5	45	0,84	11	

В табл. 7 приведены результаты испытания жира кита и трески. Жиры были проанализированы химическим методом и была уже известна величина содержания в них витамина D. Во всех случаях на бумагу наносили по 20 мг этого витамина. Бумага была пропитана 3%-ным раствором парафина. В качестве подвижной фазы служил 72%-ный метиловый спирт при переходящем способе.

Разделение провитаминов и витаминов D

Из табл. 7 ясно видно, что величины R_f для обоих жиров очень близки к величине R_f свидетеля — витамина D_3 , а не свидетеля — витамина D_2 .

В табл. 8 представлены результаты испытания тех же жиров и концентрата витамина D_2 в масле при использовании в качестве подвижного раствора 72%-ного диоксана и для пропитывания бумаги — 3%-ного раствора вазелина.

Таблица 8

Обнаружение витамина D_2 и D_3 в яичре печени кита и трески и в масляном концентрате витамина D_2

Наименование вещества, нанесенного на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см		R_f	Длина пятна в см
	в мл	в мг	т°	протекционный слой в масках	фазы	пятна		
Витамин D_2 (свидетель)	0,005	20	25	19	При растворении в масках	22	0,42	2,5
Масляный концентрат витамина D_2	0,002	20	25	19	При растворении в масках	22,5	0,43	2
Витамин D_3 (свидетель)	0,05	20	25	19	При растворении в масках	45	0,86	5
Жир кита	0,08	20	25	19	При растворении в масках	43	0,82	4,5
* трески	0,06	20	25	19	При растворении в масках	44	0,84	6

Из табл. 8 видно, что и в данном случае в китовом и тресковом жирах обнаружен витамин D_3 , а не D_2 . Что касается масляного концентрата витамина D_2 , в нем именно этот витамин и обнаружен.

В следующей серии опытов (табл. 9) были применены 37%-ный метиловый спирт также при переходящем способе и бумага, пропитанная 3%-ным раствором парафина. Объектами исследования служили те же жиры, что и в предыдущем опыте.

Из табл. 9 видно, что R_f так же сильно различается для витамина D_2 и D_3 , как в предыдущих опытах, и таким образом возможно использование комбинаций для разделенного определения наличия витаминов D_2 и D_3 в исследуемых объектах.

сравнительную яркость пятен, рассчитывают содержание витамина D в исследуемых пятнах, а затем во всем объеме экстрактов.

Таблица 5
Определение витамина D в облученных рыбных жирах методом спирта на бумаге, пропитанной 5%-ным раствором парафина

Наименование вещества, нанесенных на бумагу	Израс- сено в мл	Условия хроматографи- рования	Продвижение по фронту в см	R_f	Длина пятна в см		Сравнительное про- ведение пятна (в процентах)	Сравнительное софорто- вание пятна витамина D и пят- на
					фазы	пятна		
Контроль (витамин D ₂)	0,005	26	19	50	42	0,843	1	400
Экстракт жира трески	0,06	26	19	50	48,5	0,973	0,5	200
Экстракт жира китя	0,08	26	19	50	48,0	0,959	0,5	200
Экстракт синтетического витамина D ₃	0,037	26	19	50	46,5	0,934,5	Немного богаче 1	450

Отсюда можно вычислить и содержание витамина D в 1 г жира. Пример расчета приведен в табл. 6.

Наилучшее разделение пятен происходит в подвижной фазе, состоящей из 72%-ного или 78%-ного водного раствора дигексана. С этим растворителем витамин D можно определять даже в присутствии витамина A и его родственных ему веществ, если они находятся в небольших количествах, так как эти соединения движутся по бумаге значительно быстрее, чем витамин D.

Б) Определение витамина D путем колориметрирования экстракта из пятен. Для количественного определения витамина D колориметрированием экстракта из пятна на бумагу пансион по две одинаковые пробы последующего раствора.

Таблица 6
Расчет содержания витамина D в анализируемых образцах

Наименование образца	Всего экстракта, мл	Вано-электранта, мл	Содержание витамина D в пятне, ин- декс	Наймен. витамина D в пятне, ин- декс		Вано-электранта, г	Победило витамина D в 1 г жира, ин- декс
				Наймен. витамина D в пятне, ин- декс	Вано-электранта, г		
Контроль (витамин D ₂)	—	0,005	400	—	—	—	—
Экстракт жира трески	1,5	0,06	200	5000	5	1000	—
» » китя	1,5	0,08	200	3750	5	750	—
Синтетический витамин D ₃	1,5	0,037	450	18000	1	18000	—

После хроматографирования бумагу разрезают по всей длине листа на 2 равные полосы (4 см шириной каждая). На одной из полос бумаги проявлением находят место нахождения пятна. По найденному пятну отмечают положение пятна на непроявленной полоске и вырезают его с некоторым запасом по длине к верхнему и к нижнему концу. Вырезают такой же величины полоску бумаги без нацесенных растворов для контроля (бумага пропитана парафином или вазелином). Оба отрезка бумаги (пробный и контрольный) разрезают на мелкие кусочки, помещают в две пробирки и экстрагируют нагретым до 40° метиловым или этиловым спиртами (4 раза порциями по 20 мл) в течение 5 мин. на водяной бане при 40°. После охлаждения экстрагированный с бумаги парафин выпадает в осадок, его отфильтровывают. Спирт отгоняют в вакууме, сухой остаток растворяют в 1–1,5 мл хлороформа и хлороформенный раствор колориметрируют после развития окраски в реакции с SbCl₃. При расчете величину экстинкции для контрольной бумаги вычитают из величины экстинкции для бумаги с пятном и далее ведут расчет содержания витамина D с учетом объема экстракта вспомогательной плавки.

П р и м е ч а н и е. Хотя при употреблении бумаги, пропитанной касторовым маслом, удается хорошо разделить стерины с образованием небольших четких пятен, но она пригодна только для качественного определения стеринов. Для

Хроматографирование высокодейственных образцов витамина D без отделения стеринов низкодавлением способом на бумаге, пропитанной 2%-ным раствором касторового масла

Наименование вещества, нанесенных на бумагу или предполагаемых	Нанесено вещества		Условия хроматографирования		Продвижение по фронту в см	R_f	Длина пятна в см
	в мл	в г	T°	длительность в часах			
Смесь	0,025	100	22	22	—	—	—
Внесены:							
эргостерин	0,005	20	—	—	0	0	0,6
холестерин	0,01	40	—	—	0	0	0,6
7-дегидрохолестерин	0,005	20	—	—	10,5	0,21	4,5
витамин D ₂	0,005	20	—	—	18	0,36	6,0
Спиртовой концентрат витамина D ₂ (14 000 инт. ед. в 1 мл)	0,014	—	22	22	—	—	—
Проверен на присутствие:							
эргостерина	—	—	—	—	0	0	0,5
холестерина	—	—	—	—	Нет	—	—
7-дегидрохолестерина	—	—	—	—	»	—	—
витамина D ₂	—	—	—	—	18,5	0,37	4
Экстракт синтетического витамина D ₃	0,05	—	22	22	87%ный метиловый спирт	—	—
Проверен на присутствие:							
эргостерина	—	—	—	—	Нет	—	—
холестерина	—	—	—	—	0	0	0
7-дегидрохолестерина	—	—	—	—	7,2	0,41	1,5
витамина D ₂	—	—	—	—	12	0,24	4,2

определения витамина D в двух высокодейственных образцах, полученные при использовании свидетелей, составленных из смеси стеринов и витамина D₂.

В точке 1 нанесен свидетель, составленный из смеси стеринов (табл. 4), в точке 2 — спиртовой концентрат витамина D₂, в точке 3 — концентрат синтетического витамина D₃.

Из хроматограммы видно, что эргостерин и холестерин из смеси свидетелей как и надо было ожидать, остаются неподвижно в точке нанесения (1), тогда как 7-дегидрохолестерин и еще более витамин D₂ продвижутся по фронту растворителя.

В спиртовом концентрате витамина D₂ неподвижным остается эргостерин, в то время как витамин D₂ продвигается так, как и в смеси свидетелей. Наконец, при разделении концентрата синтетического витамина D₃ неподвижное пятно по своей окраске указывает на наличие холестерина, в то время как 7-дегидрохолестерин и в еще более значительной степени витамин D₃ продвигаются по бумаге вперед.

Следует отметить, что по бумаге, пропитанной парафином или вазелином, витамин D₃ идет впереди витамина D₂, а при пропитывании ее касторовым маслом их расположение является обратным.

III. Качественное определение витамина D

Качественное определение витамина D проводили двумя способами:

а) Сравнением величины и интенсивности окраски пятен, образованных исследуемым раствором и свидетелем.

б) Колориметрированием окраски, даваемой экстрактом из определяемого пятна при взаимодействии с SbCl₃.

а) Определение витамина D по окраске пятен. Величины, получаемые методом сравнения пятен, хотя и являются субъективными, но они близки к данным колориметрирования экстракта из пятен. Метод сравнения окраски пятен удобно применять при проведении серийных анализов животных тканей и при других массовых анализа. Очистку экстрактов из облученных жиров для нанесения их на бумагу проводят, как описано в методе химического определения витамина D [4]. В экстрактах необлученных жиров и тканей животных стерины отделяют вымораживанием, а витамин A — хроматографией на колонке с бентонитом [4]. В табл. 5 представлены данные определения витамина D в рыбьих жирах по методу сравнения пятен.

Зная точное содержание витамина D в контрольном пятне, объем исследуемых экстрактов, нанесенных на бумагу, и

количества метилового спирта, кристаллы стеринов растворяют в небольшом количестве бензола и насыщают бумагу.



Рис. 4. Определение витамина D в экстрактах омыленных рыбных жиров (Уменьшено в 5 раз)

Исходящая, подвижная фаза — 87%-ный метиловый спирт. Бумага пропитана 2% раствором метилового масла в хлороформе. Продолжительность хроматографирования 22 час. при $t = 22^\circ$. Подробные объяснения в табл. 4 и в тексте

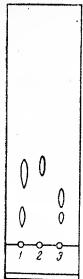


Рис. 5. Хроматографирование высокактивных образцов витамина D без отделения стеринов.

(Уменьшено в 5 раз)
Исходящая, подвижная фаза — 87%-ный метиловый спирт. Бумага пропитана 2% раствором метилового масла в хлороформе. Продолжительность хроматографирования 22 час при $t = 22^\circ$. Подробные объяснения в табл. 4 и в тексте

Характеристика хода определения витамина D после отделения стеринов показана в табл. 3 и на хроматограмме (рис. 4).

Нанесенные пробы:

1 — нанесен свидетель, составленный из смеси стеринов (табл. 3); 2 — концентрат синтетического витамина D₃; 3 — облученный жир трески; 4 — облученный жир, партия 19; 5 — облученный жир, партия 20.

На хроматограмме видно, что из смеси свидетелей эргостерин и холестерин остаются неподвижными в точке наложения, а 7-дегидрохолестерин и витамин D₃ продвигнулись вперед по фронту растворителя. В исследуемых 4 пробах витамина D проявился вперед. Несомнительное различие R_f витамина D₃ и D₂, а также витаминов жиров, объясняется тем, что вытяжки

Разделение провитаминов и витамина D

Таблица 3

Определение витамина D в экстрактах омыленных рыбных жиров на бумаге, пропитанной 8%-ным раствором парафина

Наименование вещества, нанесенных на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования	Продвижение фронту в см		R_f	Длина пятна в см
	в мг	в пр%		температура в часах	подвижная фаза		
Смесь	0,025	100	22	22	87%-ный метиловый спирт	—	—
эргостерин	—	—	29	—	—	0	0,5
холестерин	—	—	40	—	—	0	0,5
7-дегидрохолестерин	—	—	20	—	—	12,5	0,25
витамин D ₃	—	—	20	—	—	16,5	0,31
Экстракты из:							
синтетического витамина D ₃ *	0,05	—	22	—	87%-ный метиловый спирт	17,5	0,35
облученного жира	0,05	—	22	22	При стекании растворителя длина пятна 30 см	19,5	0,39
трески	0,05	—	22	22	—	17,5	0,35
облученного жира (партия 19)	0,01	—	22	22	—	15	0,30
облученного жира (партия 20)	0,05	—	22	22	—	—	3

П р и м е ч а н и е. Пятна, образованные витамином D, при проявлении все окрашивались одинаково в лимонный цвет.

* Синтетический витамин D₃ растворен в тресковом жире.

из указанных образцов, после отделения стеринов, не подвергались хроматографической очистке (см. раздел IV).

Высокактивные образцы витамина D (спиртовые и масляные концентраты, содержащие в 1 мл 10 000 инт. ед. витамина и выше), а также содержащие небольшое количество стеринов (до двух мг), можно хроматографировать без отделения последних. В табл. 4 и хроматограмме (рис. 5) показаны результаты

5 Витаминные ресурсы

CO₂, которая конденсируется с NH₂ тиимидинового кольца, образуя трехкольцевую конфигурацию. Строение тиохрома представлено на рис. 1.

Тиохром, в противоположность тиамину, хорошо растворим в высокомолекулярных спиртах и изоспиртах, обладает интен-

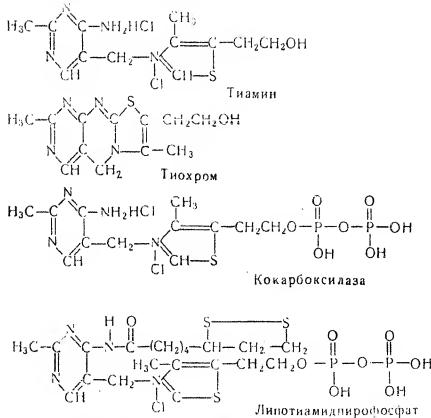


Рис. 1. Формулы тиамина и его производных

ситетной группой флуоресценцией, и это его свойство было использовано Йенсеном в 1936 г. для химического определения тиамина [1].

Было предложено много модификаций тиохромного метода, из которых следует указать на метод И. К. Мурри [2], широко применявшийся в ряде лабораторий. Недостатком как первоначального метода Йенсена, так и метода Мурри является отсутствие стадии адсорбции тиамина, необходимой для получения чистых вытяжек, что приводит к получению запыленного со дна раствора тиамина в исследуемых образцах, на чем мы и более остановимся ниже.

Под влиянием фосфата от молекулы кокарбоксилазы отщепляются остатки фосфорной кислоты и кокарбоксилаза переходит в свободный тиамин. Таким образом, определение тиамина с применением ферментативного гидролиза и без него дает возможность определить свободный и связанный тиамин. Отщепление кокарбоксилазы от белка осуществляют кислотным гидролизом.

В основе разработанного нами метода лежит метод Генисса [3].

Прежде чем перейти к описанию метода, мы приведем данные по определению тиамина в различных образцах с применением адсорбции тиамина и без нее (табл. 1).

Из приведенной таблицы видно, что почти во всех случаях (кроме инъекций и сердцевины картофеля) найденное содержание тиамина значительно выше при применении адсорбции тиамина.

При этом, чем больше в образцах пигментов (конкура картофеля, ржаной сухари), тем больше разница между результатами этих двух способов определения. Объяснение этого следует видеть в очень высоких показателях неокисленных вытяжек, не подвергнутых адсорбции. Окисление вытяжки, видимо, приводит к удалению целого ряда посторонних флуоресцирующих веществ, в то время как в контрольных пробах (неокисленные вытяжки) наличие этих соединений приводит к новышению показателя флуоресценции. За счет этого разница между окисленной и неокисленной пробами уменьшается и тем в большей степени, чем больше посторонних флуоресцирующих веществ присутствует в вытяжке.

Ниже приводим описание применяемого нами метода.

Необходимые реактивы

1) Стандартный раствор тиамина: 10 мг тиаминахлорида растворяют в 100 мл 0,01 н. HCl. Сохраняется на ходу без порчи в течение длительного времени. Для приготовления

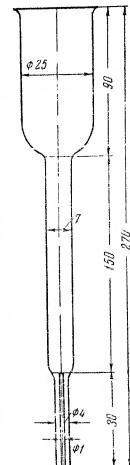


Рис. 2. Колонка для адсорбции вытяжки тиамина B₁

Предлагаемый профилактический метод является физиологически более правильным в том отношении, что у животных не развивается глубоких авитаминозов, отход животных поэтому отсутствует, а продолжительность испытания сокращается в два раза.

Л и т е р а т у р а

1. В а с ч а г а с ч А. Л., Coates M. E. a. M i d d l e t o n T. R. Biological test for vitamin P activity. — Biochem. J., 36, 407, 1942.
2. R u s z n y a k S. a. B e n k o A. Experimental vitamin P deficiency. — Science, 94, 25, 1941.
3. M a j o v s k i G. J., Lesser A. J., L a w s o n I. C., C a r n e H., T h i e n e s C. H. Vascular fragility and permeabilities influenced by various agents. — J. Pharmacol. Exptl. Therap., 80, 1-7, 1944.
4. К у р с а н о в А. Л., Б у к и н В. И., П о в с л о д к а я К. Іл. и З а п р о м е т о в М. Н. Биологическое действие чайного танина. — Биохимия, 15, № 4, 1950.
5. С е л е з е н е в а А. А. Исследование функциональной способности сосудистой системы. — Сб. «Витамины в теории и практике», № 2, т. III, вып. II, 1941.
6. L a y o n n a y J. Prolongation des effets de l'adrénaline sur l'intestin isolé de cobaye, en présence de substances polyphénoliques naturelles dérivées de la flavone (phénol-benzo-γ-ruténe). — Compt. rend. soc. biol., 135, 1193-1197, 1941.
7. И с а ч е н к о В. Б. Влияние аскорбиновой кислоты и рутин на действие адреналина. — Бюлл. эксп. биол. и мед., № 4, 1951.
8. G a b é M. et P a g e o t J. Action de la vitamine C₂ (P) sur la structure de la glande thyroïde. — J. de physiol., 40, 62, 1948.
9. Д у р м и н и д а е С. В. и Б у к и н В. И. Физиологические свойства дубильных и красящих веществ винограда. — ДАН СССР, 76, 703, 1951.
10. К у р с а н о в А. Л., З а п р о м е т о в М. Н. и Е р о ф е е в а Н. Н. Влияние активности катехинов чайного листа. — Биохимия, 17, № 6, 1952.
11. Д у р м и н и д а е С. В., Б у к и н В. И. и Е р о ф е е в а Н. Н. Биологическое испытание разных типов виш. — ДАН, 88, № 1, 1953.
12. Б у к и н В. И. и Е р о ф е е в а Н. Н. Сравнительная Р-витаминная активность катехинов чая, дубильных веществ винограда и рутин гречихи. — ДАН СССР, 98, № 6, 1954.

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р

Институт биохимии им. А. Н. Баха, Москва

В. Н. В У К И Н, К. Л. П О В О Л О Ц К А Й,
А. А. К О Н Д Р А Ш О В А и Е. Н. С К О Р О Б О Г А Т О В А

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИАМИНА

Тиамин встречается в природе как в свободном состоянии, так и в виде двух коферментов. Икрофосфорный эфир тиамина является простетической группой фермента карбоксилазы, осуществляющего окислительно-декарбоксилирование икронаградной кислоты с образованием CO₂ и ацетальдегида или ацетина (ацетилметилкарбоната). Помимо того, кокарбоксилаза при соединении с так называемой «липопондной» кислотой образует липотиамид-цистеофат, являющийся активной группой фермента, осуществляющего окислительное декарбоксилирование икронаградной кислоты с образованием CO₂ и использованием полученного ацетина путем переноса через кофермент А для всех реакций ацетилирования, которые известны для пантотеновой кислоты, например для образования лимонной кислоты из шавелево-уксусной.

Тиамин является соединением пиримидинового и тиазолового колец через четвертичный азот. Его строение и строение его производных представлено на рис. 1.

Тиамин (свободный и гидрохорид) представляет собой белое кристаллическое вещество с точкой плавления 249-250°. Максимум поглощения его раствора лежит в области 245-247 мк. Тиамин хорошо растворим в воде, разведенных кислотах, в водоспиртовых смесях, в чистом этиловом спирте его растворимость меньше. Нерастворим в хлороформе, эфире, бензоле, бутиловом и изобутиловом спирте. Тиамин устойчив к повышенной температуре в кислой среде, но разрушается при нагревании в щелочной и щелочнокислой средах.

Под влиянием окислителей тиамин превращается в тиохром, при этом группа СII тиазолового кольца прерывается в группу

Таблица 2
Животные контрольной группы
Опыт № 70

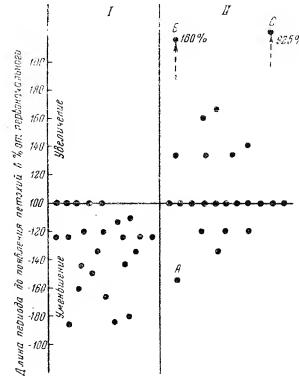
Метка (№ крысы)	Вес в г		Дневной привес в г	Период до появления петехий в сен.		% удлинения периода до появления петехий
	7.VIII	7.IX		7.VIII	7.IX	
25	85	100	0,5	20	20	0
26	87	110	0,7	40	30	-25
27	90	100	0,3	25	25	0
28	93	112	0,6	15	45	0
29	76	87	0,3	35	5	-86
30	82	99	0,5	45	25	-45
31	95	128	1,1	20	10	-50
32	92	144	0,7	30	20	-34
33	85	115	1	25	20	-20
34	88	146	0,9	30	10	-67
35	95	124	0,9	10	10	0
36	98	118	0,6	35	30	-15
37	72	85	0,4	20	15	-25
38	96	110	0,5	55	40	-82
39	77	82	0,4	80	70	-13
40	78	95	0,6	20	15	-25
41	82	88	0,2	20	20	0
42	75	92	0,5	25	5	-80
43	71	82	0,3	60	35	-42
44	76	105	0,9	50	40	-20
45	75	84	0,3	95	60	-37
46	73	97	0,8	20	15	-25
47	78	100	0,7	25	10	-60
48	94	120	0,9	20	15	-25

Среднее арифметическое дневных привесов опытной группы равно 0,8 (без учета привеса крыс № 10 и 20; № 10 — дала очень большой привес, крыса № 20 — больная).

Среднее арифметическое удлинения периода до появления петехий для данной группы (без учета показателя для крыс № 4 и 22, данных большой привес, и для крысы № 6 — больной) равно +8,6%.

Среднее арифметическое дневных привесов контрольной группы равно +0,6 г. Среднее арифметическое удлинение периода до появления петехий у животных контрольной группы равно минус 32% (см. рисунок). На рисунке представлены данные измерения периода до появления петехий для каждого животного опытной и контрольной групп.

Из приведенных журнальных выписок видно, что чайный танин, в склонившей дозе 2 мг на крысу, не только не вызывает уменьшения периода до появления петехий, но увеличивает его и, следовательно, укрепляет стенки капилляров, в то время как в контрольной группе период до появления петехий уменьшается на 32%. Привесы животных контрольной группы несколько ниже привесов животных опытной группы.



Влияние чайного танина на длительность периода до появления петехий

Черными точками обозначены длительность периода до появления петехий для каждого испытываемого животного. I — у животных контрольной группы; II — у животных опытной группы. Буквами А, В, С отмечены точки, резко отличающиеся от других и не принимавшиеся в расчет при вычислениях

Аналогичными опытами удалось установить относительную эффективность разных дозировок и фракций чайного танина [10], сравнивать Р-витаминную активность танина винограда и виноградных вин [11], рутин из листьев гречихи [12] и других источников витамина Р.

смеси). Ежедневно в кашу подмешивают иодированный казеин (25 мг на каждого животное в день).

Иодированный казеин вводился для усиления обмена веществ и скорейшего истощения запасов изучаемого витамина в организме. Этот прием за последние годы получил широкое распространение при витаминологических исследованиях и оправдал себя.

На такой диете животные содержат в течение 30 дней. Животные отрицательного контроля никаких добавок к вышеупомянутому рациону не получают. Животные опытных групп ежедневно получают ту или иную добавку исследуемых веществ через рот. Скармливание производят из специальной толстостенной пищетки с резиновой грушей на конце.

Через 30 дней, в конце опыта, животных взвешивают и у них вновь определяют период до появления патухий. Определение проводят спустя 3 часа после последнего кормления испытуемым веществом.

Способ получения¹ подиодированного казеина

20 г казеина помешают в 700 мл дистиллированной воды, содержащей 5 г NaHCO₃, и растворяют при помешивании, смесь помешают в водяную баню с температурой 38–40°.

3,7 г тонкого порошка иода добавляют маленькими порциями в течение 3–4 часов. Раствор непрерывно тщательно перемешивают механической мешалкой. После добавления требуемого количества иода раствор оставляют при температуре 70° при тщательном помешивании на 18–20 часов. После дигидризации подиодированный казеин осаждают при изофлактрической точке, высушивают и размельчают в мелкий порошок.

Вычисление результатов опыта

При вычислении результатов опыта первый отсчет времени появления патухий для каждого животного принимают за 100 %. Животные, показатели которых резко отличаются от показателей основной массы животных данной группы, в обработку не берутся.

P-активным веществом считается такое, которое при скармливании животным в течение 30 дней поддерживает сохранение первоначального периода до появления патухий или приводит к повышению его у 80 % животных данной группы (в каждой

группе должно быть не менее 20 животных). Средние дневные привесы групп животных, получавших P-активное вещество, должны быть выше, чем у животных контрольной группы, не получающих добавок. Основным показателем Р-витаминной активности вещества является увеличение периода до появления точечных кровоподтеков.

Приводим пример журнальной записи одного из опытов по испытанию препарата Р-витаминной активности чайного танина (табл. 1 и 2).

Таблица 4

Группа животных, получавших чайный танин

Опыт № 70. Испытываемое вещество – чайный танин *

Дневная доза 2 мг

Метка (№ крысы)	Вес в г		Период до появления патухий в сек.		% уединения периода до появления патухий
	7.VII	7.IX	7.VII	7.IX	
1	85	125	4,3	15	45
2	95	116	0,7	25	25
3	95	120	0,8	45	20
4	85	96	0,4	35	360
5	92	130	4,2	20	20
6	95	118	0,7	75	30
7	99	140	1,3	45	45
8	88	100	0,4	25	40
9	86	121	4,4	20	20
10	93	141	1,6	45	45
11	90	125	4,4	60	60
12	71	93	0,7	45	25
13	87	118	4	25	20
14	82	108	0,5	40	40
15	78	110	4	15	20
16	83	108	0,8	30	20
17	94	105	0,3	80	80
18	73	109	1,2	15	20
19	92	98	0,2	20	20
20	71	64	-0,2	25	20
21	85	91	0,2	40	40
22	80	115	1,4	25	65
23	87	111	0,8	25	35
24	87	115	0,9	50	40

* Препарат чайного танина был получен в лаборатории А. Л. Курсанова.

** Большая крыса.

щитовидную железу, авторы и приняли в качестве показателя Р-витаминной активности привесы подопытных животных. Для более яркого проявления действия щитовидной железы в дни эту животных вводили иодированный казеин. Животные, получавшие иодированный казеин плюс витамин Р, давали больший привес по сравнению с контрольными животными, получавшими иодированный казеин без витамина Р.

На способности витамина Р усиливать накопление аскорбиновой кислоты в тканях [9] основан дополнительный показатель его действия, сводящийся к определению количества аскорбиновой кислоты в почках, надпочечниках, селезенке и печени морских свинок. Вводимая опытным и контрольным животным аскорбиновая кислота накапливается в значительно больших количествах в той группе, которая получила витамин Р.

Ранее мы использовали лечебный метод испытания Р-витаминных веществ. Опыт длился 2 месяца; первый месяц представлял собой предварительный или истощающий период, во время которого все животные получали дозу без добавки исследуемого вещества. В течение второго месяца на той же длине продолжали оставаться животные группы отрицательного контроля, животные же опытных групп получали добавки исследуемых веществ. У всех животных отмечали длительность периода до появления петехий и определяли все тела перед началом опыта, в конце истощающего периода и в конце опыта. Позже мы отказались от проведения предварительного истощающего периода и начинали скармливание животным испытуемых веществ с первого дня перевода на опытный рацион.

В предлагаемой нами в данной работе методике имеются 2 показателя действия витамина Р — укрепление резистентности кровеносных капилляров и привес животных.

В этой модификации методика применялась нами лишь в профилактических опытах; ее описание дается ниже.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Р-ВИТАМИННОЙ АКТИВНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Формирование опытных групп

Опыт проводится на белых крысах весом 70—95 г. В опыте должны поступать молодые животные из одного питомника, находившиеся в равных условиях выращивания и содержания. Желательно проводить опыт на крысах одного пола (лучше

на самцах) или составлять смешанные группы таким образом, чтобы в них было равное число самцов и самок. Содержать самцов и самок необходимо в отдельных клетках.

Ход опыта, диэта

Обработанных для опыта животных метят и завещивают. Для каждого животного отмечают длительность периода до появления петехий в секундах при отрицательном давлении — на 200 мм ртутного столба ниже атмосферного. Определение периода до появления петехий проводят путем наложения вакуумных присосок на брюшко животного, предварительно отогнувши и смазавши вазелином для лучшего контакта с стеклянной воронкой (присоской), имеющей диаметр, равный 1 см. Высыпывание или бритье волос вызывает раздражение кожи, а иногда и мелкие кровоизлияния и вследствие этого применяться не может.

При определении периода до появления петехий животное лучше не привязывать, а спокойно держать в руках, чтобы не вызывать побочного фактора раздражения, что несколько изменяет показатель периода появления петехий. Необходимо регистрировать петехии на одних и тех же участках тела животного, так как скорость их появления на разных участках тела различна. Кровоизлияния видны через стеклянную присоску простым глазом, для лучшей видимости можно использовать лупой.

При появление двух отчетливо видных кровоизлияний оста-
паются скопуломер, присоску снимают и через лицу вторично проверяют наличие кровоизлияний на данном участке кожи.

После завзвешивания и установления длительности периода до появления петехий животных переводят на диету следующего состава:

	в %
Соевый йогурт	54,3
Кукуруза молотая	46,3
CaCO ₃	0,6
CaHPO ₄	0,9
NaCl	0,44
MgSO ₄ · 4H ₂ O	0,04

Кукурузу варят, затем к остывшей капле подмешивают остальные компоненты смеси. Кроме того, животные получают сухие некарбонатные дрожжи (10% от общего веса смеси 2 раза в неделю) и рыбий жир (3 раза в неделю по 5% от общего

B — показания флуорометра для стандартного раствора, содержащего 0,4 мг в 1 мл;
0,4 — содержание рибофлавина в мг на 1 мл стандартного раствора;
P — навеска в г;
v — общее разведение в мл.

Б. Методика определения кислотно-гидролизуемого и фосфатазно-отщепляемого рибофлавина

Для определения кислотно-гидролизуемого и фосфатазно-отщепляемого рибофлавина остается в силе метод, разработанный пами ранее совместно с Е. П. Скоробогатовой [4].

Навеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и переносят в колбу, куда добавляют 0,1 н. H_2SO_4 до общего разведения 1 : 15 или 1 : 20. Смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., охлаждают до 30°, pH вытяжки доводят до 4,5, насыщенным раствором уксусно-кислого натрия. К вытяжке прибавляют ферментативный препарат кларазы или мицелия *Penicillium* для освобождения рибофлавина из нуклеотидной формы. Препарат добавляют из расчета 30 мг на 1 г сухого вещества навески. Вытяжку помещают в термостат на 12—16 часов. Затем вытяжку доводят водой до такого объема, чтобы общее разведение было равно 1 : 25 или 1 : 30, и вытяжку фильтруют. 10 мл вытяжки обрабатывают перманганатом калия и хлористым оловом с гидросульфитом натрия точно так, как это описано при определении общего количества рибофлавина. Объем вытяжки доводят до 15 мл. Измерение интенсивности флуоресценции производят так, как это описано выше. Расчет содержания рибофлавина производят по той же формуле.

Если производить измерение флуоресценции вытяжки, подвернутой только кислотному гидролизу без ферментативной обработки, то можно определить сумму свободной и мононуклеотидной форм рибофлавина без динуклеотидной формы.

Вариант 2-й

Общее содержание рибофлавина и его форм можно определить и по другой методике, в основе которой лежит применение трихлоруксусной кислоты.

При определении общего содержания рибофлавина (что соответствует разделу А в 1-м варианте) материал подвергают

совершенно такой же обработке, как это указано в 1-м варианте, но вместо обработки материала фосфатазными препаратами применяют трихлоруксусную кислоту. Из вытяжки после 12—16-часового настаивания в термостате с протеолитическими ферментами, доведения объема до общего разведения 1 : 25 или 1 : 30 и фильтрации берут 5 мл фильтрата, добавляют 5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты и смесь нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут. После этого вытяжку охлаждают, добавляют 1/4 объема 4 М раствора K_2HPO_4 , окисляют перманганатом калия и восстанавливают хлористым оловом и гидросульфитом натрия, как это указано в 1-м варианте. Объем доводят до 15 мл и производят измерение флуоресценции.

Определение суммы кислотно-гидролизуемых форм рибофлавина (что соответствует разделу Б в 1-м варианте) производят следующим способом, в основе которого лежит метод Ловри [3]. Навеску материала растирают с определенным объемом воды, добавляют равный объем 20%-ной трихлоруксусной кислоты и вытяжку нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 минут, фильтруют, добавляют 1/4 объема 4 М раствора K_2HPO_4 , окисляют перманганатом калия и восстанавливают хлористым оловом и гидросульфитом натрия, как указано выше.

Следует отметить, что для большинства животных тканей и для тех растительных продуктов, которые лишены пигментов, можно проводить определение без окисления перманганатом калия и восстановления хлористым оловом. Это во многом упрощает метод определения, но уже небольшое содержание пигментов заставляет применять способ окисления.

Определение флуоресценции в этом варианте следует проводить измерением флуоресценции рабочего раствора рибофлавина, приготовленного не на воде, а на растворе трихлоруксусной кислоты, для чего в мерную колбу на 100 мл вносят 37,5 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, 24 мл 4 М раствора K_2HPO_4 , 1 мл стандартного раствора рибофлавина и объем доводят водой до 100 мл. Флуоресценция такого стандарта слабее на 8—10% флуоресценции стандарта, приготовленного на воде.

2-й вариант имеет перед 1-м преимущество в быстроте проведения определения и получении более очищенных вытяжек. Недостатком этого способа является замедленное тушение флуоресценции гидросульфитом натрия, вследствие чего следует проводить его 2—3 раза, для этого в кюветы повторно вносят гидросульфит натрия и снова измеряют флуоресценцию.

так как содержание рибофлавина в препаратах не превосходит указанной величины.

Все указанные ферменты могут быть использованы в качестве протестических ферментов, в качестве же фосфатазных в препаратах следует использовать лишь кларазу и препарат из минделя.

Помимо вышеуказанных реагентов следует иметь раствор 20%-ной трихлоруксусной кислоты и 4 М раствор K_2HPO_4 , которые необходимы в тех случаях, когда определение производят по 2-му варианту, о чем будет сказано ниже.

Необходимые приборы

1. Флуорометр, снабженный чувствительным гальванометром, двумя специфичными светофильтрами с максимумами пропускания около 430 м μ (первый светофильтр) и 525 м μ (второй светофильтр) и пробирками или кюветами для испытываемых растворов.

2. Механическая качалка, желательно с круговыми качанием, на 12–16 гнезд.

Вариант 1-й

А. Методика определения суммарного содержания рибофлавина (общий рибофлавин)

Навеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера (рН 7,8–8,0). Растирающую массу переносят в колбу с добавлением того же буферного раствора, так, чтобы общее разведение было около 1 : 15 или 1 : 20, смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., охлаждают до 30°, проверяют значение pH и, в случае сдвига в кисловую зону, что часто наблюдается при работе с кислыми объектами, снова доводят величину pH до 7,8–8,0, после чего к смеси добавляют ферментный препарат (трипсин или кларазу—30 мг на 1 г сухого вещества). Смесь помещают в термостат при 37° на 12–16 час. При этом от белка отщепляется прочная связь с ним форма рибофлавина. Затем pH смеси доводят до 4,5, прибавляя 0,1 н. H_2SO_4 , вносят препарат фосфатазы (кларазу или высушенный мицелий *Penicillium*) и снова ставят в термостат при 37° на 12–16 час. для расщепления нуклеотидных форм рибофлавина. После этого объем вытяжки

Флуорометрический метод определения рибофлавина

доводят до общего разведения 1 : 25 или 1 : 30 и вытяжку фильтруют через складчатый фильтр.

10 мл фильтрата окисляют раствором перманганата калия, для чего к вытяжке прибавляют по каплям 4%-ный раствор KMnO_4 до тех пор, пока красноватая окраска не перестает исчезать. Обычно добавленное количество не превышает 0,2–0,5 мл. Вытяжку оставляют на 10 мин. для окисления посторонних флуоресцирующих веществ или веществ, маскирующих флуоресценцию рибофлавина. Через 10 мин. прибавляют по каплям 3%-ный раствор H_2O_2 до исчезновения окраски перманганата калия. Затем к вытяжке прибавляют 0,2 мл рабочего раствора SnCl_2 и 0,1 мл 2,5%-ного раствора гидросульфита натрия для восстановления посторонних флуоресцирующих веществ, при этом сам рибофлавин переходит в лейкоформу.

Вытяжку энергично встряхивают в течение 20 мин. для того, чтобы обратимо-восстановленный рибофлавин перешел в окисленную флуоресцирующую форму. После прохождения окисления и восстановления объем вытяжки доводят до 15 мл и, если вытяжка мутная, то ее фильтруют. После этого производят измерение интенсивности флуоресценции посредством флуорометра.

Флуорометрия. Вытяжку и стандартный рабочий раствор рибофлавина помешают в две одинаковые пробирки или кюветы и измеряют интенсивность их флуоресценции посредством флуорометра по шкале гальванометра. В обе пробирки прибавляют на кончике пинцета NaHCO_3 и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (примерно по 0,1 г) для тушения флуоресценции рибофлавина и снова производят измерение интенсивности флуоресценции. При этом в стандартном растворе флуоресценция рибофлавина тушится до пузы. В исследуемых вытяжках остается небольшая флуоресценция, обусловливаемая посторонними флуоресцирующими веществами, которые сохраняются в вытяжках, несмотря на обработку перманганатом калия и хлористым оловом с гидросульфитом натрия.

Расчет содержания рибофлавина производят по формуле:

$$\frac{(A-B) \cdot 0,4 \cdot v}{B P} = \text{мг рибофлавина в 1 г вещества},$$

где A — показания флуорометра для испытуемого раствора (1-й отчет);

B — показания флуорометра для испытуемого раствора после тушения (2-й отчет);

Таблица 1
Содержание рибофлавина в образцах при их различной обработке
(в мг на 1 г)

Предварительная обработка	Ферментная обработка	Формы рибофлавина	Содержание рибофлавина			
			в горяч. (секунд.)	в пипет. (секунд.)	в кипят. фасе	в сироп.
0,1 н. H_2SO_4	—	Свободный и мононуклеотид	1,66	0,66	0,26	0,70
То же	Фосфатаза, pH 7,5	Свободный, мно- и динуклеотиды	2,33	1,20	0,34	1,57
10%-ная трихлор-уксусная кислота	—	То же	2,38	1,20	0,32	1,47
Фосфатный буфер pH 7,8	{ Фосфатаза, pH 4,5 Трипсин, pH 7,8	» »	2,48	1,30	0,40	1,67
То же	{ Трипсин, pH 7,8 Фосфатаза, pH 4,5	Все 4 формы	3,50	2,40	0,64	1,95
» "	{ Трипсин, pH 7,8 10%-ная трихлор-уксусная кислота	То же	3,70	2,40	0,64	1,98

Это достигается действием фосфатазных препаратов или трихлоруксусной кислоты после воздействия протеолитических ферментов. Из приведенных данных видно, что в последнем случае во всех исследуемых объектах определяется значительно больше рибофлавина, чем определялось в первом случае.

Ниже приведено описание разработанного нами метода определения общего содержания рибофлавина и его различных форм.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ РИБОФЛАВИНА И ЕГО РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ

Наша работа была направлена на разработку метода определения общего содержания рибофлавина, учитывавшего и неявно обнаружившую его форму. Разработана следующая методика, позволяющая определять общее содержание рибофлавина и различно его различные формы.

Необходимые реактивы

1. Стандартный раствор рибофлавина: навеску рибофлавина (10 мг) растворяют в мерной колбе на 250 мл (в 1 мл такого раствора содержится 40 мкг рибофлавина). Раствор стоец в течение месяца при хранении в темноте на холода. Непосредственно перед определением каждый раз приготовляют рабочий раствор следующим образом: в мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл стандартного раствора и доводят водой до метки.

2. 0,1 н. раствор серной кислоты.

3. Фосфатный буфер pH 7,8—8,0: приготовляют М/15 раствор $KNaHPO_4 \cdot 2H_2O$, т. е. 11,876 г в 1 л, и М/15 раствор KH_2PO_4 , т. е. 9,078 г в 1 л. На 95 частей первого раствора берут 5 частей второго раствора. pH буферной смеси проверяют по универсальному индикатору.

4. 2,5 М раствор уксусокислого натрия: растворяют 340 г CH_3COONa в 1 л воды.

5. 3%-ный раствор $KMnO_4$. Раствор приготовляют каждые 2 недели.

6. 3%-ный раствор H_2O_2 .

7. Раствор хлористого олова: основной раствор готовят растворением 10 г $SnCl_2$ в 25 мл концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят в темной склянке с притертой пробкой при комнатной температуре. Рабочий раствор приготовляют каждый раз перед определением, разбавляя водой 0,2 мл основного раствора до 100 мл.

8. Раствор гидросульфита натрия: 0,25 г $Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в 10 мл 2%-ного раствора двууглекислого натрия. Раствор приготовляют перед употреблением.

9. Ферментные препараты: трипсин, панкреатин, клараза или ферментный препарат из мицелия *Penicillium*. Мицелий, отжатый от лишайной влаги лабораторным прессом до содержания 25—30% сухих веществ, высушивают при температуре не выше 45°, мелко растирают и хранят в сухом и темном месте. При внесении в вытяжку следует ферментный препарат расстирать в ступке с небольшими количествами буфера или раствора уксусокислого натрия (в зависимости от того, какую форму рибофлавина надо определить). Рекомендуется определить содержание рибофлавина в ферментных препаратах, и если оно превосходит 5 мг на 1 г, вычесть из общего обнаруженного количества рибофлавина то его количество, которое внесено с ферментным препаратом. Обычно этого не приходится делать,

8 Витаминные ресурсы

Рибофлавин входит в состав простетической группы целого ряда окислительно-восстановительных ферментов, при этом в «старом желтом ферменте» и в оксидазе L-аминокислот рибофлавин присутствует в виде мононуклеотида, а в днафоразе, флавин присутствует в виде мононуклеотида и в виде флавин-ксантиноксидазе и оксидазе D-аминокислот — в виде флавин-

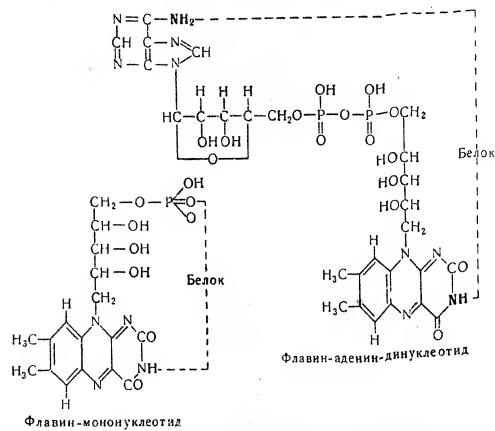


Рис. 3. Строение нуклеотидных форм рибофлавина

аденин-динуклеотида. Какие ферментативные функции выполняет вновь обнаруженная форма рибофлавина, в настоящее время неизвестно.

Современные методы определения рибофлавина основаны на его способности к флуоресценции. При этом следует учесть, что рибофлавин и его мононуклеотид обладают одинаковой флуоресценцией, флавин-аденин-динуклеотид обладает лишь 10—15% флуоресценции свободного рибофлавина [3], а связанные с белком формы не флуоресцируют.

Для освобождения рибофлавина из его динуклеотида и для разрыва связи с белком применяют кислотный гидролиз и

обработку ферментными препаратами, обладающими фосфатазным действием. Для этой цели можно применять и трихлоруксусную кислоту [3]. Для освобождения вновь обнаруженной формы рибофлавина наилучшие результаты были нами получены при гидролизе материала в слабощелочных условиях и обработке его протеолитическими ферментами типа трипептина. При этом

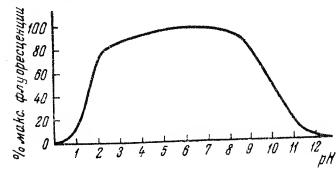


Рис. 4. Кривая флуоресценции рибофлавина в зависимости от pH.

На оси ординат — максимум флуоресценции в %;

на оси абсцисс — величина pH

освобождающуюся форму рибофлавина (видимо динуклеотид) необходимо для отщепления от нее свободного рибофлавина подвергнуть вторичной ферментной обработке фосфатазами препаратами или гидролизу трихлоруксусной кислотой.

Интенсивность флуоресценции рибофлавина в сильной мере зависит от pH растворов, падая как в сильнокислой зоне, так и в щелочной (рис. 4); поэтому перед измерением флуоресценции следует pH растворов всегда доводить до 5—6.

В табл. 1 приведено содержание рибофлавина в разных об разцах при их различных обработках.

Данные, приведенные в табл. 1, показывают, что при гидролизе 0,1 н. H_2SO_4 без обработки ферментом определяется значительно меньше рибофлавина, чем в случае применения обработки ферментными препаратами. При обработке трихлоруксусной кислотой ферментный гидролиз не требуется.

Если материал подвергнуть кислотному гидролизу, затем действию фосфатаз, а после этого добавить трипептина, то флуоресценция не повышается, так как в этих условиях отщепляется флавин-динуклеотид, который для развития полной флуоресценции должен еще подвергнуться расщеплению фосфатазами.

Sanitized Copy Approved for Release 2010/07/22 : CIA-RDP81-01043R000400230005-3

Утверждено к печати
институтом биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Редактор издательства А. А. Бирдевль
Технический редактор Е. В. Макуши

*

РИСО АН СССР № 93—53В. Сдано в набор 21/IV 1955г.
Подписано к печати 24/VIII 1955 г. Формат бум. 60×92 $\frac{1}{4}$.
Печ. л. 12,25 Уч.-вид. л. 11,0 Тираж 3000.
Т—06394. Издат. № 958. Типогр. звк. 1285.
Длина 8 р. 30 к.

Издательство Академии наук СССР,
Москва, Б-34, Проспект академика Сахарова, д. 21
2-я типография Издательства АН СССР
Москва, Шубинский пер., 10

ОПЕЧАТКИ

Страница	Строка	Нанесчтано	Должно быть
21	4 си.	Лугунов CH ₃ CH—	Лугунов CH ₃ CH—
30	в формуле		
185	12 си.	(н. л. а.)	(ч. л. а.)

Витаминные ресурсы и их использование Сб. 3
Методы определения витаминов

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	3
И. Н. Гаркина. Химический и спектроскопический методы определения витамина А	4
И. Н. Гаркина и В. Н. Букин. Химический метод определения витамина Д	22
И. Н. Гаркина. Хроматографический метод разделения провитаминов и витаминов Д	53
И. Н. Ерофеева. Биологический метод определения D-витаминной активности («проба на черту»)	74
И. Н. Ерофеева. Биологический метод определения Р-витаминной активности	82
В. Н. Букин, К. Л. Поволоцкая, А. А. Кондратова и Е. П. Скоробогатова. Флуорометрический метод определения тиамина	91
А. Дмитровский. Использование катионита СДВ-3 при флуорометрическом методе определения витамина В ₁	100
К. Л. Поволоцкая, П. И. Зайцева и Е. П. Скоробогатова. Флуорометрический метод определения рибофлавина	108
К. Л. Поволоцкая, Е. П. Скоробогатова и Н. И. Зайцева. Микробиологический метод определения рибофлавина	124
К. Л. Поволоцкая и Н. И. Зайцева. Хроматографический метод разделения рибофлавина и его нуклеотидов	129
О. И. Пушкинская и Л. С. Кудева. Микробиологический метод определения никотиновой кислоты (витамина PP)	133
Н. А. Помощникова. Микробиологический метод определения пиридоксина (витамина В ₆)	145
Н. А. Помощникова. Микробиологический метод определения пантотеновой кислоты	152

точных анализах обезжиривание рекомендуется проводить спиртом или ацетоном. Затем материал заливают бензином (легким фракции), или петролейным эфиром, перемешивают и переносят на адсорбционную колонку, наполненную воздушно-сухой окисью марганца или окисью алюминия. Бензин добавляют небольшими порциями до тех пор, пока выхлопящий из колонки раствор не станет совершенно бесцветным. Раствор бензина просасывают через адсорбционную колонку, вставленную через пробку в колбу Бунзеля, посредством водяного или ручного масляного насоса. При этом каротин не задерживается на колонке, проходит через нее, а хлорофилл, ксантифилл и другие пигменты его адсорбируются.

Бензиновые вытяжки переносят в мерную колбу или мерный цилиндр с притертой пробкой, доводят бензином до определенного объема и производят колориметрирование.

В качестве стандарта может быть использован 0,036%-ный раствор $K_2Cr_2O_7$, при этом 1 мл такого раствора соответствует 0,00208 мг β -каротина*.

Расчет производят по следующей формуле:

а) при определении посредством фотоэлектроколориметра:

$$\frac{a \cdot v \cdot 100}{p} = \dots \text{мг\% каротина},$$

где:

a — показание фотоэлектроколориметра, переведенное по вкладу в количество каротина в 1 мл раствора в мг;

p — навеска материала в г;

v — объем бензиновой вытяжки в мл;

100 — пересчет на 100 г, для получения результатов, выраженных в мг% каротина.

б) При определении на обычном колориметре:

$$\frac{h \cdot 0,00208 \cdot v \cdot 100}{h_1 p} = \dots \text{мг\% каротина},$$

где:

h — показания колориметра для стандартного раствора (обычно 10 мм);

h_1 — показания колориметра для исследуемого раствора;

0,00208 — коэффициент для пересчета результатов в мг каротина;

p — навеска в г;

v — объем бензиновой вытяжки в мл;

* β -каротин является международным стандартом. В качестве стандарта вместо $K_2Cr_2O_7$ может быть также использован азобензол.

100 — пересчет на 100 г, для получения данных, выраженных в мг% каротина.

При определении каротина в моркови нет необходимости бензиновые вытяжки пропускать через колонку с адсорбентом; их колориметрирование можно проводить сразу, так как в моркови почти исключительно содержится каротин без примесей посторонних пигментов.

Литература

1. Мурри И. К. Быстрый метод количественного определения каротина. Биохимия, 2, № 6, 4937. Новый метод извлечения каротина из сырого зеленого растительного материала. — Доклады ВАСХИНА, вып. 4, 1943.

Е. Л. ПОВОЛОЦКАЯ, Н. И. ЗАЙЦЕВА
и Е. П. СКОРОБОГАТОВА

ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА

Рибофлавин (6,7-диметил-9-д-рибозил-изоаллоказин) — кристаллическое вещество с температурой плавления 292°, его молекулярный вес 344. Растворы рибофлавина обладают желтой окраской и желто-зеленой флуоресценцией. Рибофлавин растворим в воде, в метиловом, этиловом, бутиловом и амиловом спиртах. В эфире, бензоле и хлороформе он не растворим.

Рибофлавин очень чувствителен к свету. Освещение его растворов при щелочных значениях pH приводит к отщеплению от его молекулы боковой цепи, содержащей 4 водородных атома, и образованию люмифлавина, вещества, обладающего, так же как и рибофлавин, желтой окраской и желто-зеленой флуоресценцией, но, в противоположность рибофлавину, растворимого в хлороформе. На способности люмифлавина растворяться в хлороформе были основаны первые методы его определения [1].

При освещении рибофлавина в кислотных или нейтральных растворах от его молекулы отщепляется вся боковая цепь, при этом происходит перемещение водородного атома, изоаллоказин превращается в аллоказин и образуется вещество, называемое люмихромом (6,7-диметил-аллоказин). Люмихром представляет собой бесцветное вещество, обладающее голубой флуоресценцией. Строение рибофлавина, люмифлавина и люмихрома представлено на рис. 1.

Рибофлавин обладает характерной кривой абсорбции с тремя максимумами при 270, 370 и 450 мк (рис. 2). Ярко выражены у рибофлавина окислительно-восстановительные свойства. Он легко восстанавливается гидросульфитом натрия, также другими восстановителями, и превращается с присоединением

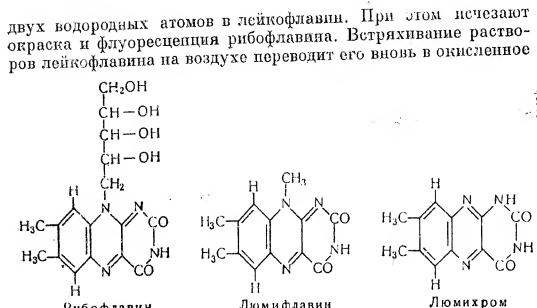


Рис. 1. Строение рибофлавина и продуктов его фотолиза

соединения — рибофлавин, с восстановлением окраски и флуоресценции.

В настоящее время известно четыре формы, в которых рибофлавин присутствует в природных источниках: свободный рибофлавин, флавин-мононуклеотид и недавно обнаруженная форма, существование которой было установлено К.Л.Поволоцкой [2]. Последнее вещество является, видимо, такое флавин-адениндинуклеотидом, но соединено оно с белком не через фосфорную кислоту, а, вероятно, пептидными связями. Строение пуклеотидных форм рибофлавина представлено на рис. 3, при этом в формуле флавин-адениндинуклеотида выделены 2 группы (амидная и имидная), через которые, возможно, осуществляется связь вновь открытого соединения с белком.

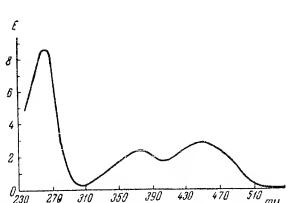


Рис. 2. Спектр абсорбции рибофлавина

ВЫВОДЫ

1. В целях более широкого использования флуорометрического метода определения витамина В₁ исследованы различные способы отделения мешающих примесей и найдено, что вместо дефицитного адсорбента декалько с успехом можно пользоваться катионитом СДВ-3.

2. При разработке метода определения витамина В₁ с использованием катионита СДВ-3 установлен способ активирования и регенерации катионита, степень измельчения и высота столбика для адсорбции, объем и температура элюирующей смеси.

3. Показано, что катионит СДВ-3 обладает примерно в 8 раз большей сорбционной динамической емкостью, чем адсорбент декалько.

4. Сравнительное определение витамина В₁ в 14 объектах с катионитом СДВ-3 и в декалько, а также определение добавленного к объектам исследования витамина показали хорошее совпадение результатов.

Л и т е р а т у р а

- Методы определения витаминов. Всесоюзн. н.-и. витам. ин-т, Пищепромиздат, М., 1951.
- Methods of vitamin assay. Ed. The association of vitamin chemists. New-York, 1951.
- Сегеседо Л. Р. а. Непенессу Д. Ж. The use of synthetic zeolites in the isolation of vitamin B₁. — J. Am. chem. soc., 59, № 9, 1617, 1937.
- Непенессу Д. Ж. а. Сегеседо Л. Р. The determination of free and phosphorylated thiamin by a modified thiochrome assay. — J. Am. chem. soc., 61, № 9, 179, 1939.
- Астрафьев В. И. Технология пермутитового водоумягчителя. — Труды Ин-та промстайл минералогии, 1953.
- Герасимов И. И. Количественное определение витамина В₁ тиахромином методом в моче, крови и лактозе. — Биохимия, 6, вып. 2, 140, 1941.
- Елисеева Г. Д. Флуорометрическое определение тиамина, кофакторов и рибофлавина в биологических объектах. — Витамины. I. Методы исследования, естественные ресурсы и биохимия витаминов. Ин-т биохимии АН УССР. Изд. АН УССР. Киев, 1953, стр. 38—58.
- Труфанова А. В. и Кирсанова В. А. Одновременное получение кристаллического рибофлавина, очищенного концентраты тиамина и аргостерина из пекарских дрожжей. — Биохимия, 9, вып. 5, 239, 1944.
- Букини В. И., Половинская Н. Л., Кондратова А. А. и Скоробогатова Е. П. Флуорометрический метод определения тиамина. См. настоящий сборник, стр. 91.

- Аршидзе Х. И. и Таворткладзе Е. К. Исследование грузинских бентонитовых глин как дегидрирующих контактов. Сообщение 1.— Журн. прикл. химии, 18, № 4—5, 274, 1945.
- Вечер А. С. и Гриянский О. Б. Аксорбционно-фотометрический способ определения тиамина (витамина В₁). — Биохимия, 18, вып. 6, 743, 1953.
- Шерман О. С. Тиахроминный метод Яисена для определения содержания в моче витамина В₁. — Врачебное дело, 7, 631, 1948.
- Гельд И. А. и Григоров О. Н. Пермутитовые свойства силикагеля. Сб. Химические анатиты и нефелины. 1932.
- Негг D. S. Synthetic ion exchange resins in the separation, recovery and concentration of thiamin. — Ind. a. eng. chem. (Indust. ed.), 37, № 7, 631, 1945.

шом содержании примесей в исследуемом объекте, что видно из табл. 3.

Таблица 3

Сравнительное определение витамина В₁ различными методами

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ в $\mu\text{г}$ на 1 г объекта естественной влажности		
	Соо- бога- бога	декаль- ко	с катион- том СДВ-3 (1)
Инцини (зерно)	—	3,22	3,14
Мука инциничная (72%-ного выхода)	4,61	3,14	3,20
Греческая каша	—	7,00	7,00
Горох (семена)	—	9,71	9,66
Фасоль (семена)	5,36	8,5	8,5
» (листья)	1,31	1,31	1,31
Картофель (середина клубни)	0,78	0,71	0,72
» (кожура клубни)	0	0,52	0,51
Печень говядины	0,47	0,56	0,56
» ягн.	—	3,09	3,09
Молоко коровье	0,470	0,180	0,178
Сухари ржаные	0,431	2,43	2,43
Моча человека	0	0,79	0,79
Дрожжи пекарские прессованные	—	9,02	9,02
		11,1	1,00

Из табл. 3 видно не только хорошее совпадение результатов, получаемых во всех случаях для декалько и катионита СДВ-3, но и возможность определения витамина В₁ в ряде объектов (листья фасоли, картофель, молоко) без адсорбентов. Само собою разумеется, что контрольные анализы необходимы всякий раз при решении вопроса о допустимости упрощенного анализа.

Убедившись в пригодности катионита СДВ-3 для замены декалько, мы дополнительно определили содержание витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования, а также добавленного в 5%-ных вытяжках из материала (2 $\mu\text{г}$ на 15 мл, что составляло 2,66 $\mu\text{г}$ на 1 г материала). Полученные результаты приведены в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что добавленный к объектам исследования витамин В₁ был обнаружен в количестве 97—103%.

Таблица 4
Определение витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования и добавленного к нему, по методу с катионитом СДВ-3

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ до и после добавления его в количестве 2,66 $\mu\text{г}$ на 1 г материала		
	до добав- ления	должно быть после добавле- ния	Фактиче- чески полу- чено
Пшеница (зерно)	3,22	5,88	6,00
Мука пшеничная (72%-ного выхода)	3,14	5,80	5,70
Греческая мука	7,00	9,66	9,66
Горох (семена)	9,71	12,37	12,00
Фасоль (семена)	8,50	11,16	11,16
» (листья)	1,31	3,97	4,05
Картофель (середина клубни)	0,71	3,37	3,47
» (кожура клубни)	0,52	3,48	3,48
Печень говядины	0,56	3,22	3,32
» кишка	3,09	5,75	5,70
Молоко коровье	0,18	2,84	2,87
Сухари ржаные	2,43	5,09	5,09
Моча человеческая	0,79	3,45	3,52
Дрожжи пекарские прессованные	9,02	11,68	11,90

Следует отметить, что величины флуоресценции для окисленных и неокисленных проб с декалько и катионитом СДВ-3 во всех случаях были очень близки друг к другу, что также указывает на одинаковый характер их действия. Регенерацию катионита СДВ-3 производили так же, как это принято для адсорбента декалько [9], но при температуре не выше 60—70°.

Для получения хороших воспроизводимости результатов анализа следует придерживаться следующих дополнительных указаний:

1) элюцию следует производить 30 мл 25%-ного раствора KCl в 0,1 н. HCl порциями по 6—7 мл, а не 25 мл [9];

2) разница в концентрации витамина В₁ между стандартными и испытуемыми растворами не должна быть больше чем в 1,5 раза; если эта разница больше, то следует приготовить дополнительный стандартный раствор;

3) в качестве смазки для кранов и пробок рекомендуется использовать глицерин, но не вазелин, ибо последний содержит много флуоресцирующих примесей.

шом содержании примесей в исследуемом объекте, что видно из табл. 3.

Таблица 3

Сравнительное определение витамина В₁ различными методами

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ в % на 1 г объекта естественной влажности			II-I/100
	без адсорбента	декалько	катионит СДВ-3	
Пшеница (зерно)	—	3,22	3,14	-2,5
Мука пшеничная (72%-ного выхода)	1,61	3,14	3,20	+2
Гречневая каша	—	7,00	7,00	0
Горох (семена)	—	9,71	9,66	-0,5
Фасоль (семена)	5,36	8,5	8,5	0
» (листья)	4,31	4,31	4,31	0
Картофель (середина клубни)	0,78	0,71	0,72	+1
» (кожура клубни)	0	0,52	0,51	-2
Печень говядины	0,47	0,56	0,56	0
» киты	—	3,09	3,09	0
Молоко коровье	0,170	0,180	0,178	-1
Сухари ржаные	0,131	2,43	2,23	7
Моча человека	0	0,79	0,79	0
Дрожжи пекарские прессованные	—	9,02	9,02	0

Из табл. 3 видно не только хорошее совпадение результатов, получаемых во всех случаях для декалько и катионита СДВ-3, но и возможность определения витамина В₁ в ряде объектов (листья фасоли, картофель, морковь) без адсорбентов. Само собою разумеется, что микролитые анализы необходимы всякий раз при решении вопроса о допустимости упрощенного анализа.

Убедившись в пригодности катионита СДВ-3 для замены декалько, мы дополнительно определили содержание витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования, а также добавленного к 5%-ным вытяжкам из материала (2 μ г на 15 мл, что составило 2,66 μ г на 1 г материала). Полученные результаты помещены в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что добавленный к объектам исследования витамин В₁ был обнаружен в количестве 97—103%.

Таблица 4
Определение витамина В₁, присутствовавшего в объектах исследования и добавленного к нему, по методу с катионитом СДВ-3

Наименование объекта	Содержание витамина В ₁ до и после добавления его в количестве 2,66 μ г на 1 г материала			Обнаружено витамина В ₁ в % от этого количества
	до добавления	после добавления	фактически найдено	
Пшеница (зерно)	3,22	5,88	6,00	102
Мука пшеничная (72%-ного выхода)	3,14	5,80	5,70	98
Гречневая мука	7,00	9,66	9,66	100
Горох (семена)	9,71	12,37	12,00	97
Фасоль (семена)	8,50	11,16	11,16	100
» (листья)	1,31	3,97	4,05	102
Картофель (середина клубни)	0,71	3,57	3,47	103
» (кожура клубни)	0,52	3,18	3,18	100
Печень говядины	0,56	3,22	3,32	103
» киты	3,09	5,75	5,70	99
Молоко коровье	0,18	2,84	2,87	101
Сухари ржаные	2,43	5,09	5,09	100
Моча человека	0,79	3,45	3,52	102
Дрожжи пекарские прессованные	9,02	11,68	11,90	102

Следует отметить, что величины флуоресценции для окисленных и неокисленных проб с декалько и катионитом СДВ-3 во всех случаях были очень близки друг к другу, что также указывает на одинаковый характер их действия. Регенерацию катионита СДВ-3 производили так же, как это принято для адсорбента декалько [9], но при температуре не выше 60—70°.

Для получения хорошей воспроизводимости результатов анализа следует придерживаться следующих дополнительных указаний:

1) элюцию следует производить 30 мл 25%-ного раствора KCl в 0,1 н. HCl порциями по 6—7 мл, а не 25 мл [9];

2) разница в концентрации витамина В₁ между стандартными и испытуемыми растворами не должна быть больше чем в 1,5 раза; если эта разница больше, то следует приготовить дополнительный стандартный раствор;

3) в качестве смазки для кранов и пробок рекомендуется использовать глицерин, но не вазелин, ибо последний содержит много флуоресцирующих примесей.

стандартного раствора витамина В₁ с содержанием 1 мг в 1 мл в тех же условиях соответствует 79 делениям гальванометра. Из табл. 1 видно, что наилучшее отделение примесей (см. вторые цифры) достигается при обработке декалько, обработке по Елисеевой почти не уменьшает их содержания по сравнению с необработанным материалом, способ Труфanova и Кирсановой в этом отношении несколько лучше, но также недостаточно эффективен.

Освобождение от примесей путем применения адсорбентов

В опытах с адсорбентами мы использовали четыре катионита, изготовленные проф. И. П. Лосевым А. С. Тевялиной в Менделеевском химико-технологическом институте им. Д. И. Менделеева и любезно нам предоставленные. Пользуемся случаем выразить им благодарность.

Помимо этого испытывали природные бентонитовые адсорбенты аскант и гумбрин, а также силикагель, которые также можно рассматривать как обладающие катионно-обменными свойствами [5, 6, 10, 11, 12, 13], витамина В₁ — как катион [14]. Для сравнения был использован декалько.

Исходя из многочисленных указаний о трудности десорбции витамина В₁ с природных адсорбентов и катионитов, мы исследовали этот вопрос с чистым витамином. Силикагель марки АСК и различные катиониты предварительно измельчали примерно до такой же степени, как адсорбент декалько (фракции от 0,5 до 1,3 мм — 70%, меньше 0,13 — 30%). Адсорбенты и катиониты обрабатывали троекратно 10%-ным HCl каждый раз по 2 часа при 40—60° для освобождения от примесей желса. Затем адсорбенты активировали так же, как это принято для адсорбента декалько, т. е. при температуре около 100° [19], а катиониты — при температуре не выше 60—70° ввиду их термолабильности. Для адсорбции брали по 50 мг витамина В₁ в 10 мл воды и пропускали через адсорбционные трубки с внутренним диаметром 3 мм и высотой столбиков адсорбентов, равной 6 см, катионитов — 8 см (всегда каждого столбика около 2 г). Степень адсорбции проверяли во всех случаях. Первую элюцию проводили 25%-ным раствором KCl в 0,1 л. HCl при 70—90°, вторую — 18%-ной HCl без нагревания. Для элюции в обоих случаях применяли около 25 мл раствора, порциями по 6—7 мл 3—4 раза. Полученные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2
Сравнение полноты элюции витамина В₁ с различных адсорбентов

Наименование адсорбента	Количество обнаруженного витамина В ₁ в процентах от взятого его количества	
	1-я элюция — 25%-ным раствором KCl в 0,1 л. HCl	2-я элюция — 18%-ным раствором HCl
Декалько	100	0
Аскант	0	32
Гумбрин	0	78
Силикагель АСК	100	0
Катиониты:		
МСФ	0	44
МСФ-3	0	48
СБС	0	20
СДВ-3	100	0

Из табл. 2 видно, что первая элюция дает 100%-ный выход витамина А только при использовании декалько, силикагеля АСК и катионита СДВ-3.

Для исследования сорбционной емкости адсорбентов через адсорбционные трубы с декалько, силикагелем АСК и катионитом СДВ-3 пропускали раствор витамина В₁ в концентрации 100 мг в 1 мл воды со скоростью 60 мл/час. Прекращение поглощения витамина наблюдалось только после сорбции соответственно 26, 62 и 218 мг на 2 г каждого адсорбента. Таким образом, катионит СДВ-3 обладает примерно в 8 раз большей сорбционной емкостью, чем декалько. Этим можно воспользоваться не только для аналитических целей, но и для очистки и концентрирования витамина В₁, например, при синтетическом его производстве.

Проведены многочисленные испытания катионита СДВ-3 с силикагелем АСК по сравнению с декалько на различных объектах, мы пришли к выводу, что силикагель АСК дает недостаточно воспроизводимые результаты, в то время как катионит СДВ-3 во всех случаях давал отличное совпадение данных с результатами, полученными с декалько, даже при очень боль-

тем меньшие количества исследуемого вещества можно обнаружить. При работе со стеринами 23%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе оказался мало чувствительным реагентом для эргостерина и совсем непригодным для проявления холестерина в количествах до 20 мг. Судя по литературным данным, очень чувствительным реагентом на стерины является 20%-ный раствор пятихлористой сурьмы в хлороформе, но в нашем распоряжении этого реагента не было.

Пульверизация хроматограммы раствором треххлористой сурьмы сопряжена с большими затруднениями и вредностью. Для преодоления этих трудностей была подобрана концентрация треххлористой сурьмы, пригодная для определения указанных стеринов, и разработан безвредный способ проявления хроматограмм. Разделение стеринов оказалось затруднительным вследствие близкого сходства их строения (табл. 1).

Таблица 1
Основные свойства некоторых стеринов

Наименование стеринов	Молекулярный вес	Количество двойных связей в молекуле	Наличие активных групп
Эргостерин	396,6	3	-OH
Холестерин	386,6	1	-OH
7-Дегидрохолестерин	384,6	2	-OH
Витамин D ₂	396,6	4	-OH
Витамин D ₃	384,6	3	-OH

Как видно, из активных групп, имеющих значение в хроматографии, у стеринов есть только гидроксильная группа, причем ею обладают все указанные стерины, а их различия по молекулярному весу весьма незначительны. Единственным различием между ними является только число двойных связей. Все это усложнило подбор подвижной фазы для разделения смеси стеринов, состоящей из эргостерина, холестерина, 7-дегидрохолестерина и витаминов D₂ и D₃. Было испытано несколько десятков комбинаций из разных растворителей: метилового, этилового, пропиленового, нормального бутилового, изоамилового и бензилового спиртов, дихлорана, бензола, толуола, ксиола, ацетона, фенола, петролейного эфира и диэтиламина. Были проверены также хлорсодержащие растворители: хлороформ, 4-х хлористый углерод и дихлорэтан.

Исследование перечисленных растворителей показало, что посредством одних из них получаются небольшие компактные пятна стеринов, ярко проявляющиеся раствором треххлористой сурьмы (хлорсодержащие растворители и нормальный бутиловый спирт), по эти растворителям непригодны в качестве подвижной фазы, так как дают одинаковую величину R_f для всех стеринов.

Другие растворители, особенно различной крепости дихлоран и спирты метиловый и этиловый, разделяют стерины, но для четкого разделения требуются подбор и особая обработка хроматографической бумаги.

Было испытано более десятка различных сортов хроматографической бумаги без применения и с применением той или иной обработки. Бумагу отмывали соляной кислотой, подвергали ацетилированию [3], на нее наносили раствор KH_2PO_4 различной концентрации ($M/2$, $1 M$ и $2 M$). Была проверена роль пропитывания бумаги растворами касторового масла, парафина, вазелина, стearиновой и пальмитиновой кислот. Испытание целого ряда подвижных фаз, отмывания и пропитывания бумаги показало, что стерины можно разделить только при сочетании нескольких подвижных фаз, специфичных для отдельных стеринов, и определить их при использовании в качестве свидетелей химически чистых стеринов и витаминов D₂ и D₃.

Наиболее пригодной оказалась хроматографическая бумага № 2, изготовленная Ленинградской бумажной фабрикой № 2 им. Володарского. На этой бумаге были проведены все работы по разделению стеринов. Помимо качественного обнаружения, витамины группы D в природных продуктах определяли количественно после отделения стеринов вымораживанием. Вымороженные стерины в свою очередь собирали для дальнейшего разделения их на бумаге.

НЕОВХОДИМЫЕ РЕАКТИВЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

I. Реактивы

1. Метиловый спирт, перегнанный над сухим NaOH или KOH с отбором фракции при 65°.

2. Этиловый спирт для освобождения от альдегидов оставляют на ночь с твердым химически чистым NaOH (10 г на 1 л спирта) и затем отгоняют. Наиболее тщательной очистки спирта

5. Вадимов В. М. Биологический и спектрографический методы исследования препаратов витаминов. Д. Издательство Академии наук СССР, 1946.
6. Ewing D. T., Powell M. J., Brown R. A. a. Emmett A. D. Determining vitamin D₂ by two physical-chemical methods.—Anal. Chem., 20, 317 (1948).
7. Lamb F. W., Müller A. a. Reach C. W. Quantitative determination of ergosterol, cholesterol and 7-dehydrocholesterol by antimony trichloride method.—Ind. Eng. Chem., 48, 487 (1946).
8. Sobel A. E., Mayer A. M. a. Krammer B. New colorimetric reaction of vitamins D₂ and D₃ and their provitamins.—Ind. Eng. Chem., 47, 160 (1945).
9. Campbell J. A. Modified glycerol dichlorhydrin reaction for vitamin D₃.—Anal. Chem., 20, 766 (1948).
10. Ewing D. T., Kingsley G. V., Brown W. A. a. Emmett A. D. Physical-chemical method for determination of vitamins D in fish liver oils.—Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 15, 301 (1943).
11. Nield C. H., Russell W. C. a. Zimmerman A. The spectrophotometric determination of vitamins D₂ and D₃.—J. Biol. Chem., 148, 245 (1943).
12. De Witt J. B. a. Sullivan M. X. Spectrophotometric procedure for quantitative estimation of vitamins D.—Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 18, 117 (1946).
13. Венде В. П. Методы количественного определения жирорастворимых витаминов А, D₂, D₃ и Е.—Витамины. I. Методы исследования естественные ресурсы и биохимия витаминов. Изд. Академии наук УССР, Киев, 1953.
14. Green J. Studies on the analysis of vitamins D.—Biochem. J., 49, pp. 36–58 a. 232–246 (1951).

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

И. Н. ГАРКИНА

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ ПРОВИТАМИНОВ И ВИТАМИНОВ D

Метод хроматографии на бумаге за последние годы получил широкое применение для качественного и отчасти количественного анализа органических и особенно неорганических соединений.

Разделение сложных органических смесей хорошо разработано в отношении аминокислот, сахаров, антибиотиков, ряда алкалоидов и других водорастворимых соединений. Разделение смеси не растворимых в воде соединений методом хроматографии на бумаге еще недостаточно разработано в силу большой сложности вопроса. Имеются лишь отдельные работы по разделению витаминов Е, витаминов А; особенно успешно было проведено разделение кетостеринов после предварительного их перевода в гидразоны с реагентом Герарда [1]. По разделению самих стеринов только начинаясь появляться отдельные работы [2]. Хроматографическое разделение стеринов имеет большое значение не только потому, что к ним относятся интересующие витаминную промышленность провитамины и витамины группы D, но и потому, что обмен стеринов привлекает все большее внимание работников теоретической и практической медицины.

Нашей задачей являлась разработка метода разделения стеринов путем хроматографии на бумаге с целью характеристики природных материалов в отношении содержания в них провитаминов и витаминов D. Следует сказать, что при проведении данной работы были встречены весьма значительные затруднения, которые мы и стремились преодолеть.

Хроматографии на бумаге большое значение имеет проявление разделяемых соединений. Чем чувствительнее проявитель,

ство тахистерина вычисляют по разности между результатами определения в анализируемой пробе без конденсации с малениновым ангидридом и с конденсацией. При расчете содержания витамина D учитывают все сделанные в ходе анализа разведения.

Пример расчета. К 1 мл спиртового концентратра витамина D прибавили 9 мл спирта. Из этого раствора на анализ был взят 1 мл. На цветную реакцию с треххлористой сурьмой взято 0,5 мл. Всего колориметрируемого хлороформенного раствора было 15 мл. Экстинкция проб без конденсации с малениновым ангидридом $E = 0,36$.

По калибровочной кривой экстинкции 0,36 соответствуют 900 инт. ед. в 0,5 мл колориметрируемого раствора,
 $900 \times 2 = 1800$ инт. ед. в 1 мл колориметрируемого раствора,

$1800 \times 15 = 27\,000$ инт. ед. в 15 мл колориметрируемого раствора,

$27\,000 \times 10 = 270\,000$ инт. ед. в 1 мл спиртового концентратра.

После конденсации с малениновым ангидридом экстинкция $E = 0,29$;

$0,29 = 775$ инт. ед. (в 0,5 мл колориметрируемого раствора),
 $775 \times 2 = 1550$ инт. ед. (в 1 мл колориметрируемого раствора),

$1550 \times 15 = 23\,250$ инт. ед. (в 15 мл колориметрируемого раствора),

$23\,250 \times 10 = 232\,500$ инт. ед. витамина D в 1 мл спиртового концентратра,

$270\,000 - 232\,500 = 37\,500$ инт. ед. приходится на долю тахистерина.

Следовательно, в 1 мл анализируемого спиртового концентратра содержится: 232 500 инт. ед. витамина D (86%), а обнаруженные сверх этого 37 500 инт. ед. (14%) обусловливаются окраской, развиваемой тахистерином.

Если определение тахистерина не требуется, то весь ход анализа без конденсации с малениновым ангидридом опускают и расчет витамина D производят по примеру, указанному для пробы, обработанной малениновым ангидридом.

Приведенный анализ спиртовых концентратов позволяет контролировать процесс облучения эргостерина и определять:

1) процент подвернутого фотолизу эргостерина (смолки) путем определения количества непрореагировавшего эргостерина по реакции с дигитонином и вычтении этой величины из начального его содержания в облучаемом растворе;

2) процентное содержание в смолке витамина D путем проведения полного анализа;

3) процентное содержание в смолке тахистерина по разности между определениями без конденсации с малениновым ангидридом и с конденсацией (по п. 2);

4) процентное содержание прочих фотопроизводных в смолке по разности между общим ее количеством (п. 1) и суммой витамина D и тахистерина.

ВЫВОДЫ

1. Разработан химический метод количественного определения витамина D в облученных и необлученных рыбных жирах, а также в масличных и спиртовых концентратах, получаемых путем облучения эргостерина.

2. Метод основан на осаждении стеринов дигитонином, удалении из растворов тахистерина путем его конденсации с малениновым ангидридом и отделении витамина А и других мешающих определению веществ при помощи адсорбции на бентоните. В подготовленных для анализа очищенных растворах определение витамина D производят по реакции с треххлористой сурьмой в хлороформе, пользуясь в качестве стандарта для сравнения растворами чистого кристаллического витамина D_2 .

3. Метод позволяет контролировать процесс облучения эргостерина в отношении общего выхода фотодериватов (смолки) и содержания в них витамина D, тахистерина и суммы прочих фотопроизводных.

4. Сопоставление определений витамина D разработанным химическим методом с биологическими испытаниями показало хорошее совпадение, складывающееся в среднем в $\pm 12,0\%$.

Литература

- Гаркина И. Н. и Букин В. Н. Химический метод определения витамина D в рыбных жирах.—Биохимия, 16, вып. 2, 1951.
- Букин В. Н. и Ерофеева И. Н. Биологический метод определения и результаты испытания рыбных жиров и других продуктов морского промысла на витамин D.—Витаминные ресурсы и их использование. Сб. 4. Витаминные ресурсы рыбной промышленности. Изд. АН СССР, 1951.
- Гудильт М. А. О химическом определении витамина D в рыбных жирах (I-е сообщение).—Витамины в теории и практике, 1, вып. 3, стр. 35. Пищепромиздат, 1941.
- Энгельгардт В. А. и Татарская Р. И. Сборник технологических инструкций по производству витаминов. Пищепромиздат, 1943.

в течение длительного периода маслах. Адсорбцию на бентоните проводят так же, как описано выше в разделе I.

Собранные бесцветные элюаты концентрируют в вакууме на водяной бане при температуре не выше 35—40° до 10—15 мл и этот хлороформенный раствор употребляют для колориметрирования, которое проводят, как описано выше (см. раздел I).

Пример расчета. На анализ было взято 1 г концентрации витамина D₂ в масле. После конденсации тахистерина, осаждения стеринов и хроматографической очистки было приготовлено 15 мл хлороформенного раствора для колориметрирования. При колориметрировании 0,5 мл была получена величина экстинкции $E = 0,47$. По калибровочной кривой величина экстинкции 0,47 соответствует содержание 2115 инт. ед. витамина D.

2115 инт. ед. содержится в 0,5 мл колориметрируемого раствора.

$2115 \times 2 = 4230$ инт. ед. в 1 мл колориметрируемого раствора.
 $4230 \times 15 = 63\,450$ инт. ед. в 15 мл колориметрируемого раствора.

Если ставят задачу количественного определения наряду с витамином D также тахистерина, то количество тахистерина рассчитывают по разности между результатами определения с конденсацией с малениновым ангидридом и после конденсации с малениновым ангидрилом и после конденсации. Подробный ход такого анализа приведен ниже, при описании метода определения витамина D в спиртовых растворах обученного эргостерина.

III. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D В СПИРТОВЫХ РАСТВОРАХ ОБУЧЕННОГО ЭРГОСТЕРИНА

Для анализа берут такое количество миллилитров спиртового раствора витамина D, в котором содержится около 80 000 инт. ед. витамина. Для этого малоактивные спиртовые растворы концентрируют в вакууме, сгущенный раствор охлаждают, эргостерин отфильтровывают и для анализа берут 1 или 2 мл фильтрата, учитывая предполагаемое содержание витамина D. Высокоактивные спиртовые растворы, содержащие в 1 мл 200 000—300 000 инт. ед. витамина D более, разбавляют спиртом соответственно в 10 или 20 раз. Для разбавления в 10 раз к 1 мл спиртового концентрата приливают 9 мл спирта. При расчетах содержания витамина D учитывают это разведение. Из приготовленного раствора берут 1 или 2 мл,

помещают в колбу Бюргца, кладут кусочек пемзы, отгоняют в вакууме спирт, затем приливают 5 мл бензола и так же в вакууме при 35—40° его отгоняют с целью удаления вместе с ним следов спирта и влаги. К сухому остатку приливают 10 мл бензола, определенное количество 0,7%-ного бензольного раствора или навеску сухого маленинового ангидрида по расчету, указанному методе определения витамина D в масляных растворах (см. раздел II), и проводят конденсацию тахистерина, как описано в разделе I. По окончании конденсации бензол отгоняют в вакууме при 40—45° досуха, к сухому остатку прибавляют 10 мл этилового спирта и осаждают стерин дигитонином (см. раздел I). Фильтрат после удаления дигитонина разбавляют в 2 раза водой и экстрагируют 4 раза эфиром (каждый раз по 25 мл эфира).

Для подлежащих анализу растворов, приготовленных из спиртовых концентратов с активностью 100 000 инт. ед. и выше в 1 мл, неспецифическими следами эргостерина преобладают и операцию их осаждения дигитонином отпускают. В этом случае сухой остаток после конденсации переносят (10—15 мл) спиртом в делительную воронку, туда же приливают равный объем воды и экстрагируют 4 раза эфиром порциями по 25 мл.

Эфирный экстракт отмывают водой 3 раза по 40 мл о спирта, избыток малениновым ангидрида и дигитонином (если после титрирования применяется), сушат серосульфатом натрием и эфир отгоняют в вакууме. К сухому остатку прибавляют 5 мл хлороформа и этот раствор употребляют для колориметрирования (определение витамина D без тахистерина).

Сухой остаток растворяют в 10 или 20 мл хлороформа и этот раствор употребляют для колориметрирования (определение витамина D с тахистерином).

Для определения содержания витамина D в сумме с тахистерином конденсируют с малениновым ангидридом очищают. При этом также берут 1 или 2 мл приготовленного для анализа исходного раствора, помещают в химический стаканчик, приливают 8—10 мл этилового спирта и осаждают стерин дигитонином. Осадок дигитонина отфильтровывают, фильтрат переносят в делительную воронку, приливают 10 мл воды и экстрагируют эфиром (4 раза по 25 мл). Соединенные эфирные экстракти отмывают водой (3 раза по 40 мл), сушат серосульфатом натрием и эфир отгоняют. К сухому остатку приливают 5 мл хлороформа, хлороформ отгоняют, сухой остаток растворяют в 10 или 20 мл хлороформа (как и при анализе с удалением тахистерина), полученный раствор употребляют для колориметрирования, которое проводят, как описано в разделе I.

стами пиридоксаль и пиридоксамин. Во многих пищевых продуктах, являющихся богатым источником витамина B_6 , последний присутствует преимущественно в виде пиридоксала и пиридоксамина.

Витамин B_6 или пиридоксин, можно получить путем вытравки его из природного материала или путем синтеза. Ниже приводится физическая характеристика и свойства пиридоксина.

Пиридоксин

Внешний вид соединения (основания) — бесцветный, кристаллический порошок. Внешний вид его солянощелочной соли — белый порошок. Эмпирическая формула — $C_{10}H_{14}O_3$. Молекулярный вес основания — 169. Точка плавления основания — 180° . » » гидрохлорида пиридоксина — 204—206°. pH водного раствора гидрохлорида пиридоксина — 3.2. Максимум абсорбции — 320 мк.

Растворимость пиридоксина (основания):

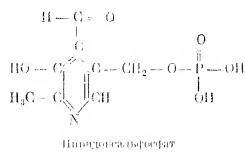
легко растворим	в воде
»	в этиловом спирте
плохо растворим	в диэтиловом эфире
»	в хлороформе
легко растворим	в ацетоне

Растворимость гидрохлорида пиридоксина:

22,2 г в 100 мл воды,
 1,1 » 100 этилового спирта,
 плохо растворим в ацетоне.
 Витамин B_6 чувствителен к действию света и устойчив относительно нагреванию, к кислоте и щелочи. Он адсорбируется на животном угле и фульевовой земле из нефтрафракций и кислых растворов и осаждается серой, фосфоровольфрамовой и кремневольфрамовой кислотами. Пиридоксин легко дегидрируется и возгоняется.

Этот витамин играет важную роль в обмене веществ. Его производное — пиридоксальфосфат входит в качестве кофактора в

мента в состав ферментов, катализирующих превращения аминокислот: декарбоксилирование, исераамирование, реакции с участием метиленовых групп, синтез и неокислительный распад триглицеридов. Витамин B_6 связан также с использованием ненасыщенных жирных кислот.



Большая часть животных и растений способна синтезировать витамин B_6 , и лишь немогие виды нуждаются в получении его извне. Недостаток в потреблении у животных приводит к заболеванию кожи и нарушениям в белковом и жировом обмене.

Цанбольшие количества витамина B_6 (25—50 мг/г) содержат дрожжи, рисовые отруби и инченные зародыши.

Многочисленные методы определения витамина B_6 могут быть разделены на 4 категории: физические, химические, микробиологические и биологические (с использованием животного организма). Однако ни одна из этих категорий методов не позволяет приступить достаточно удовлетворительно различьное определение указанных трех форм витамина.

Наиболее точно, просто и быстро пиридоксин (витамин B_6) может быть обнаружен и количественно определен микробиологическими методами. Предложенные химические методы достоверны только при исследовании чистых растворов этого витамина, биологические методы с использованием животных очень длительны и грязоздки. Этим, очевидно, и объясняется то обстоятельство, что микроорганизмы, нуждающиеся в получении витамина B_6 или его производных (пиридоксала и пиридоксамина), были широко испытаны как индикаторы на этот витамин.

Для этой цели в разное время были предложены бактерии *Lactobacillus casei* и *Serratia faecalis* [1]. Хотя при помощи бактерий удается определить отдельно пиридоксин, пиридоксаль и пиридоксамин, однако искусственные среды для культивирования этих индикаторных организмов столь сложны и

ВВОДЫ

1. Пользуясь штаммом молочнокислой бактерии *Lactobacillus arabinosus*, дефектным в отношении биосинтеза никотиновой кислоты (витамина PP), подобран и испытан метод определения этого витамина.

2. Метод является высокоспецифичным и чувствительным, позволяя вести определения при наличии 2–4 мг никотиновой кислоты (витамина PP) во взятой навеске испытуемого образца.

Литература

4. Methods of vitamin assay. New York, 1951.
5. С и о л я Э. Микробиологические методы определения витаминов. Сб. статей «Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот», ИЛ, 1954. Под ред. К. Л. Поволоцкой.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

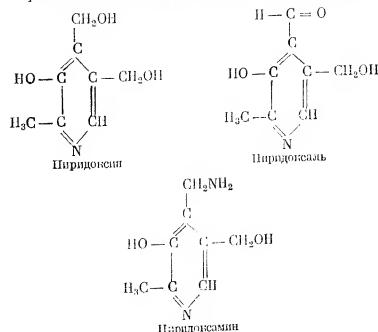
Институт микробиологии АН СССР, Москва

Н. А. ПОМОЩНИКОВА

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ПИРИДОКСИНА (ВИТАМИНА В₆)**

Витамин В₆, или пиридоксин, является широко распространенным витамином группы В.

Он входит в состав различных пищевых продуктов животного и растительного происхождения. Большая часть витамина В₆ находится в связанный форме, в комплексе с белком или с крахмалом. Установлено, что В₆ существует в 3 формах: в виде пиридоксина, пиридоксала и пиридоксамина:



Пиридоксин, идентифицированный и изолированный ранее двух других соединений, получил название витамина В₆, которое затем было распространено также на открытые впослед-

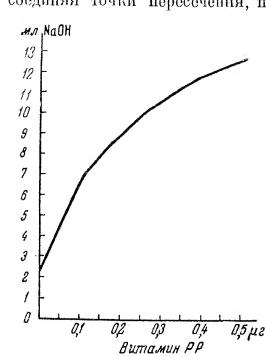
X. Обработка результатов и вычисление содержания никотиновой кислоты

Стандартную кривую вычерчивают на основе средних значений количества миллилитров NaOH, использованных при титровании, или показаний гальванометра при нефелометрии для каждой точки стандартного раствора никотиновой кислоты. На оси абсцисс откладывают абсолютные количества никотиновой кислоты, содержащиеся в каждой пробирке, па оси ординат наносят средние значения количества миллилитров 0,05 н. NaOH; соединяя точки пересечения, получают стандартную кривую, образец которой дается на рисунке. Пользуясь ею, путем интерполяции определяют содержание никотиновой кислоты в каждой из пробирок с испытуемым раствором. Далее вычисляют содержание никотиновой кислоты в миллилитре испытуемого раствора для каждой пробирки отдельно. Содержание никотиновой кислоты в испытуемом растворе вычисляют на основании результатов, полученных не менее, чем с тремя пробирками, которые не отличаются более чем на $\pm 10\%$ от среднего значения.

Конечную величину выражают обычно в микрограммах на 1 г воздушно-сухого или абсолютно-сухого испытуемого вещества или на 1 мл исходной жидкости (молоко, плазма и т. д.).

В табл. 3 приведен пример определения содержания никотиновой кислоты в пищевой обойной муке.

В заключение в табл. 4 приводим содержание никотиновой кислоты в ряде пищевых объектов растительного и животного происхождения.



Микробиологический метод определения никотиновой кислоты 143

Пример определения содержания никотиновой кислоты в пищевой обойной муке (навеска 1 г, разведение 1:500)

№ пробирки	Количество выпарки, добавленной в пробирку, в мл	Количество 0,5 н. NaOH, потребное на титрование, в мл	Обнаруженное никотиновую кислоту (в мг)		
			в пробирке	в 1 мл дистиллированной воды	в 1 г навески
1	0,5	4,2	0,050	0,080	40,0
2	0,5	4,4	0,042	0,084	42,0
3	1	5,9	0,092	0,082	41,0
4	1	5,9	0,082	0,082	41,0
5	4,5	7,4	0,130	0,086	43,0
6	4,5	7,3	0,127	0,084	42,0
7	2	8,4	0,175	0,087	43,5
8	2	8,5	0,180	0,090	45,0
9	2,5	9,0	0,210	0,084	42,0
10	2,5	8,9	0,200	0,080	40,0
			в среднем	41,9	

Содержание никотиновой кислоты в различных природных источниках (в мг на 1 г)

Объект исследования	Содержание никотиновой кислоты	Объект исследования	Содержание никотиновой кислоты
Растительные продукты:			
Рожь	4,1—43,4	Морковь	4—44,7
Испещница	44—71	Свекла	3—6
Пшеничная мука:			
воздушный сорт	7—13,5	Мукомель	0,9—5
I сорт	12,5—18,5	Крупный рогатый скот:	
II сорт	16,5—35,8	мясина	46—63,9
Пшеничные отруби	245—286	печень	78—275
Ячмень	56—87	печень	73—400
Гречиха	56	сердце	58—84
Кукуруза желтая	20	Курица:	
Овес	7	грудка мышина	86—151
Горох	22	мышина ноги	72
Подсолнух	38	печень	90—152
Соя	21	Треска	23
Дрожжи пекарские сухие	250—500	Молоко коровье	0,8—1,6
Картофель	11,8	Яйцо	1,0
Капуста	1,2—4		

4. Раствор аденин-гуанин-урацила. Отвешивают по 0,1 г аденинсульфата, гуанин-гидрохлорида и урацила, навески смешивают и растворяют в 20%-ной HCl при длительном кипчении в водяной бане, доводят после охлаждения до 100 мл и сохраняют в холодильнике.

5. Растворы витаминов. Отвешивают по 10 мг:

- тиамил-гидрохлорида,
- пантотената кальция,
- пиридоксина-гидрохлорида,
- рибофлавина,
- никотиновой кислоты,
- пара-аминобензойной кислоты,

и растворяют отдельно каждый витамин в дистилированной воде в мерных колбах на 100 мл и доводят до метки.

Рибофлавин растворяют при нагревании в кипящей бане. Растворы рибофлавина и пиридоксина необходимо сохранять в темных склянках. Все растворы витаминов сохраняют в холодильнике в склянках под слоем толуола,

ж) раствор биотина готовят с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 0,2 мг вещества. Раствор разливают по пробиркам и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 15 минут.

6. Раствор солей (А). Растворяют 25 г однососновного фосфориксилого калия (K_2HPO_4) и 25 г двусосновного фосфориксилого калия (K_2HPO_4) в 250 мл дистилированной воды. Раствор солей сохраняют в холодильнике.

7. Раствор солей (Б). Растворяют 10 г сернокислого магния ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 0,5 г хлористого натрия ($NaCl$), 0,5 г сернокислого железа ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) и 0,5 г сернокислого марганца ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) и доводят объем до 250 мл. Сохраняют в холодильнике.

III. Составление основной среды

Наиболее пригодной является основная среда следующего состава (табл. 2).

Ингредиенты вводят в указанной последовательности в колбу на 1 л, содержащую 500 мл дистилированной воды, каждый раз тщательно перемешивая. Затем доводят воду почти до одного литра, подщелачивают до рН 6,8, прибавляя 5 н. NaOH и добавляют воду точно до литра.

Таблица 2

Состав основной среды

Наименование составных частей	Весовое количество	Неходовые растворы и эл.
Глюкоза	20 г	—
Уксусонатный натрий ($C_4H_7COONa \cdot 3H_2O$)	20 г	—
Казепепный гидролизат, свободный от витаминов	10 г	100
dL-триптофан	0,4 г	20
L-истин	0,2 г	50
Аденин, гуанин, урацил	по 0,02 г	20 каждого
Тиамил-гидрохлорид	0,2 г	2
Пантотенат кальция	0,2 г	2
Пиридоксин-гидрохлорид	0,4 г	3
Рибофлавин	0,4 г	3
Пара-аминобензойная кислота	0,2 г	2
Биотин	0,00080 г	40
Раствор солей (А)	1 г	
K_2HPO_4	1 г	
KH_2PO_4	—	10
Раствор солей (Б)		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4 г	
$NaCl$	0,02 г	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02 г	
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,02 г	

IV. Выращивание неходовой культуры
Lactobacillus arabinosus

К 90 мл дистилированной воды добавляют 10 мл дрожжевого автолизата*, 1 г глюкозы и 1,5–2 г агар-агара. Нагревают смесь в водяной бане до растворения агара, разливают по пробиркам еще горячий раствор, закрывают пробирки ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 15 минут, охлаждают в наклонном положении. Засевают но менее 2–3 пробирок культурой *Lactobacillus*

* Дрожжевой автолизат готовят следующим образом: к 200 г прессованных дрожжей добавляют 200 мл прокинченной и остуженной до 60° воды. Размешивают в гомогенную массу, добавляют 0,5 мл толуола и ставят в терmostat на 48 час. при 50°. После этого 30 мин. нагревают в автоклаве при 0,5 атм. давления. Затем несколько раз фильтруют через порошку Бюхера до получения прозрачной жидкости. Осадок промывают 420 мл воды и фильтрат присоединяют к основной жидкости.

Эта реакция положена в основу распространенного химического цианибромидного метода определения никотиновой кислоты. Данный метод является более быстрым по сравнению с микробиологическим методом, но в то же время менее специфичным и чувствительным, дает завышенные результаты, особенно при испытании сильно пигментированных вытяжек [1]. Обзор микробиологических методов приведен Сиеллом [2].

При анализе материалов следует учитывать, что наиболее богаты витамином PP дрожжи, печень, мясо, рыба и зерно злаков (например, пшеница, ячмень). Рожь, овес и кукуруза бедны никотиновой кислотой. Несколько дается описание микробиологического метода определения никотиновой кислоты со штаммом молочнокислой бактерии *Lactobacillus arabinosus*, чувствительным к недостатку этого витамина в питательной среде.

Микробиологический анализ распадается на следующие этапы:

1. Подготовка испытуемого образца для анализа.
2. Приготовление растворов для основной питательной среды.
3. Составление основной питательной среды.
4. Выращивание исходной культуры *Lactobacillus arabinosus*.
5. Приготовление стандартного раствора никотиновой кислоты.
6. Приготовление культуральной среды.
7. Приготовление посевного материала.
8. Постановка опыта.
9. Учет интенсивности роста *Lactobacillus arabinosus*.
10. Обработка результатов и вычисление содержания никотиновой кислоты в исследуемых образцах.

I. Подготовка испытуемого образца для анализа

1—2 г вещества тщательно растирают в ступке с 2—3 мл 1 н. соляной кислоты и переносят в мерную колбу, сполоснув ступку 47—48 мл той же кислоты. Если исследуемый образец — жидкость, то берут 10—20 мл, добавляют 35,8—25,8 мл дистиллированной воды и 4,2 мл концентрированной соляной

кислоты. Колбы закрывают ватными пробками и аэтоактивируют при 1 атм. в течение 20 минут. После охлаждения объем вытяжки доводят до 100 мл и после перемешивания раствор фильтруют. Берут 5—20 мл фильтрата (в зависимости от предполагаемой активности образца), переносят в мерную колбу из 100 мл, добавляют 40—50 мл дистиллированной воды и нейтрализуют раствор щелочью до pH 6,8 (вначале прибавляют 5 н. раствора NaOH, а затем 0,5 н. NaOH). После доведения объема жидкости до метки образец готов для анализа. Конечный раствор должен содержать приблизительно 0,1—0,2 г никотиновой кислоты в 1 мл.

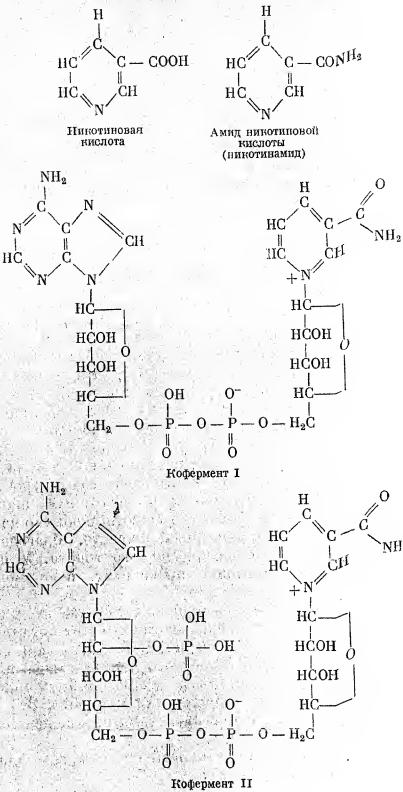
Материалы, содержащие большое количество жира, необходимо предварительно обезжиривать экстракцией серым эфиром.

II. Приготовление растворов для основной среды

1. Казеиновый гидролизат. 100 г казеина смешивают в литеевой колбе с 500 мл 20%-ной соляной кислоты. Первые 5—8 час. смесь нагревают на водяной бане до растворения казеина, а затем на плите с asbestosовой сеткой. Из полученного гидролизата при пониженном давлении отгоняют HCl, к остатку добавляют 300 мл дистиллированной воды и снова отгоняют до густоты сиропа. Указанную операцию повторяют еще раз. Растворяют оставшуюся массу приблизительно в 100 мл дистиллированной воды, доводят pH до 3,5, добавляя 5 н. NaOH; объем жидкости доводят водой до 1 л, добавляют 20 г активированного древесного угля для извлечения витаминов и встраивают в течение одного часа; затем фильтруют с отсасыванием. Еще раз повторяют обработку углем и получают бесцветный или слабожелтый раствор, который разливают в колбы по 100 мл и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 20 минут. Можно также раствор не стерилизовать, а сохранять в холодильнике под слоем толуола.

2. Раствор D1-триптофана. 1 г D1-триптофана растворяют в 30—40 мл 10%-ной HCl, доводят водой до 200 мл и сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

3. Раствор L-цистина. Отвешивают 1 г L-цистина, растворяют в 40 мл 10%-ной HCl и добавляют дистиллированной воды до 200 мл. Сохраняют в тех же условиях, как и раствор триптофана.



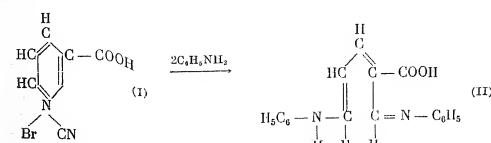
Микробиологический метод определения никотиновой кислоты 135

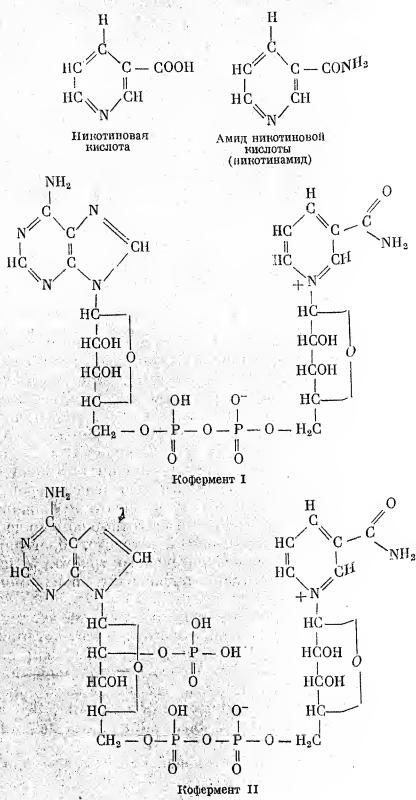
Наиболее важные свойства никотиновой кислоты и ее амида приведены в табл. 1.

Таблица 1
Свойства никотиновой кислоты и никотинамида

Свойства	Никотиновая кислота	Никотинамид
Внешний вид	Бесцветные иголки	Бесцветные иголки
Вкус	Кислый	Горький
Эмпирическая формула	C ₈ H ₇ O ₂ N	C ₈ H ₈ O ₂ N
Молекулярный вес	123,11	122,12
Точка плавления	235,5—236,5°	128—131°
Точка кипения	Возгоняется	150—160° при 5×10 ⁻⁴ мм
Гигроскопичность	Возгоняется	Слегка гигроскопична
Максимум абсорбции pH 1%-ного раствора	385 мк	212 мк
Растворимость:	3,0	6,0
воде при 25°		
спирте этиловом	1,67 г в 100 мл	100 г в 100 мл
серном эфире	0,73 г в 100 мл	66,6 г в 100 мл
глицерине при 25°	Нерастворима	Слегка растворима
	—	10 г в 100 мл

Ницотиновая кислота и ее амид устойчивы к температуре, свету, pH и окислителям. Ницотиновая кислота реагирует с цианистым бромом; образующееся при этом пиридопное соединение (формула I) вступает в реакцию с ароматическими аминами (например, анилином и др.), давая окрашенный продукт (формула II).



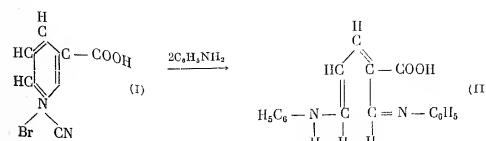


Наиболее важные свойства никотиновой кислоты и ее амива приведены в табл. 1.

Таблица 1
Свойства никотиновой кислоты и никотинамид

Свойства	Никотиновая кислота	Никотинамид
Внешний вид	Бесцветные иголки	Бесцветные иголки
Вкус	Кислый	Горький
Эмпирическая формула	C ₈ H ₇ O ₂ N	C ₈ H ₈ ON ₂
Молекулярный вес	123,11	122,12
Точка плавления	235,5—236,5°	128—131°
Точка кипения	Возгоняется	150—160° при 5×10 ⁻⁴ мм
Гигроскопичность	Негигроскопична	Слегка гигроскопичен
Максимум абсорбции	385 мк	212 мк
pH 1%-ного раствора	3,0	6,0
Растворимость в:		
воде при 25°	1,67 г в 100 мл	100 г в 100 мл
спирте этиловом	0,73 г в 100 мл	66,6 г в 100 мл
серном эфире	Нерастворима	Слегка растворим
глицерине при 25°	—	10 г в 100 мл

Никотиновая кислота и ее амид устойчивы к температуре, свету, pH и окислителям. Никотиновая кислота реагирует с цианистым бромом; образующееся при этом пиридиновое соединение (формула I) вступает в реакцию с ароматическими аминами (например, анилином и др.), давая окрашенный продукт (формула II).



Для хорошего разделения пятен необходимо выделять хроматограмму в камере в течение 15 час. как при исходящем, так и при восходящем токе растворителя. Вследствие ярко выраженной зелено-желтой флуоресценции рибофлавина и его нуклеотидов, нет необходимости в каком-либо проявлении хроматограмм; они непосредственно просматриваются в ультрафиолетовом свете. Для этой цели мы использовали обычный флуорескоп с кварцевой лампой и виолетовым светофильтром.

Для подобраных нами условий (крабовая бумага, растворитель н-бутиловый + уксусная кислота + вода, время разгонки 15 час. при температуре 23–24°) найдены следующие значения R_f для разных форм рибофлавина:

	Восходящая хроматограмма	Нисходящая хроматограмма
Свободный рибофлавин	0,27–0,30	0,33
Рибофлавин-фосфат	0,11	0,11
Флавин-динуклеотид*	0,06	0,045

Подобранные нами условия были использованы для хроматографического разделения рибофлавиновых соединений животных тканей. Извлечение рибофлавина и его соединений из животных тканей производят пищательным растиранием на весяческих тканях (0,5–1 г) с 10-кратным количеством фосфатного буфера pH 7,8–8. Смесь выдерживают в течение 45 мин. в кипящей водяной бане, охлаждают и добавляют либо трипсин, либо пентонавальный ферментный препарат кларазу (50 мг на 1 г сухого вещества) и ставят в терmostат на 12 час. при температуре 38°. Смесь отфильтровывают, в фильтрат добавляют сернокислый аммоний до полувинного насыщения и обрабатывают фенолом, предварительно насыщенным водой.

Обработку смеси фенолом проводят в делительной воронке; берут такое количество фенола, чтобы после 3–4-кратной экстракции общий его объем равнялся 0,1 объема вытяжки, доведенного до половины насыщения сернокислым аммонием; при этом рибофлавин и его нуклеотиды переходят в фенол. К фенольному экстракту добавляют 7 объемов серного эфира и 1–2 мл воды, смесь встряхивают, в результате чего флавин

* Данные R_f для флавин-динуклеотида получены при хроматографическом разделении форм рибофлавина в вытяжках из печени кролика и грудной мышцы голубя.

Разделение рибофлавина и его нуклеотидов

и его нуклеотиды переходят в воду. Водную вытяжку обрабатывают еще раз одним объемом эфира для удаления следов фенола и полученную вытяжку используют для хроматографии.

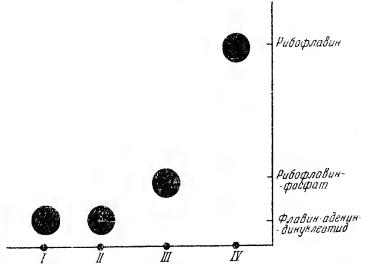


Рис. 1. Хроматограммы на бумаге вытяжек:
I — из грудной мышцы голубя, II — из печени кролика,
III — рибофлавин-фосфат, IV — рибофлавин

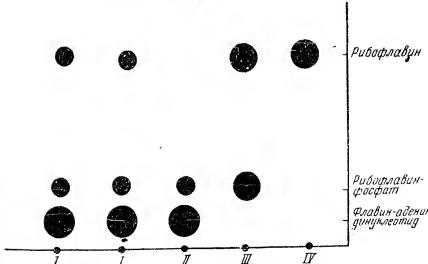


Рис. 2. Хроматограммы на бумаге вытяжек, спустя 48 час.,
наставления:
I — из грудной мышцы голубя, II — из печени кролика,
III — рибофлавин-фосфат, IV — рибофлавин

Обработку вытяжки фенолом следует проводить как можно быстрее, иначе флавин-аденин-динуклеотид разрушается до флавин-мононуклеотида. Количество вытяжки, паносимое на

удовлетворительных данных необходимо, чтобы по крайней мере 3, а лучше 5 точек, представляющих собой результаты титрования опытных вытяжек, уложились в пределах стандартной кривой.

При наличии нефелометра возможно проводить определение не путем титрования молочной кислоты, а по мутности среды. Сопоставление стандартных кривых, полученных обоими методами, дано на рис. 2.

Однако мы отдаём предпочтение титрометрическому методу, так как окраска и непрозрачность опытных вытяжек в некоторых случаях могут сказаться на точности определений, если вести их по мутности. Кроме того, бактерии образуют иногда колонии в виде комочеков, что снижает общую мутность растворов.

Приведенный метод достаточно прост, доступен и может легко применяться в тех лабораториях, которые не располагают флуориметром. Помимо этого, микробиологический метод должен быть использован при получении синтетических препаратов рибофлавина по новой схеме производства, при испытании новых способов перекристаллизации и при установлении новых форм рибофлавина в природных материалах для того, чтобы установить их биологическую активность.

В своей работе [3] по установлению существования прочно связанной с белком формы рибофлавина мы широко и с успехом применили микробиологический метод.

Литература

- Сидилл, Е. Микробиологические методы определения витаминов.— Сб. Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот. под ред. К. П. Повоцкой. Изд. ИЛ, 1954.
- Повоцкая, К. И. и Скоробогатова, Е. П. Сопоставление химического и микробиологического методов определения рибофлавина в растительном материале.— Биохимия, 18, 79, 1953.
- Повоцкая, К. Л. О новой, связанной с белком форме рибофлавина.— Биохимия, 18, 633, 1953.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

К. Л. ПОВОЦКАЯ и Н. И. ЗАЙЦЕВА

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД РАЗДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА И ЕГО НУКЛЕОТИДОВ

В предыдущей работе [1] нами была показана возможность разделенного количественного определения различных форм рибофлавина флуориметрическим методом, однако при исследованиях нередко возникает необходимость в более точной идентификации состава рибофлавиновых компонентов, и в этом отношении метод распределительной хроматографии на бумаге имеет ряд преимуществ. При разработке методики были использованы данные, приведенные в работе Краммера [2], однако нам пришлось подобрать сорт бумаги отечественной марки, пакующую смесь растворителей при работе с ней, а также способ очистки вытяжки перед хроматографированием.

Из четырех сортов испытанной хроматографической бумаги наиболее пригодной оказалась крафовая бумага Ленинградского завода.

Для проверки скорости прохождения рибофлавина и рибофлавин-фосфата, 0,001 M растворы их наносились на бумагу как в отдельности, так и в смеси. Из растворителей были испытаны следующие смеси: бензиловый спирт с уксусной кислотой, н-бутиловый спирт с салиной кислотой, н-бутиловый спирт с уксусной кислотой, 5%-ный раствор двухзамещенного фосфата натрия, смесь фенола с н-бутиловым спиртом, н-бутиловый спирт с раствором мочевины и другие, применявшиеся различными авторами [3].

В результате оказалось, что наиболее четкие хроматограммы на крафовой бумаге получаются при применении в качестве растворителя смеси из 4 объемов н-бутилового спирта, 2 объемов ледяной уксусной кислоты и 4 объемов воды. При большем количестве воды в смеси, рекомендованном Краммером [2], в наших условиях получаются менее компактные пятна.

⁹ Витаминные ресурсы

отфильтровывают, фильтрат проверяют на отсутствие следов PbS и его объем доводят до 1 л.

Раствор цистина. 4 г L-цистина суспензируют в 50 мл горячей воды, прибавляют по каплям концентрированную соляную кислоту до полного растворения цистина, доводят объем до 1 л водой.

Раствор неорганических солей готовят в двух отдельных колбах. Раствор А содержит в 250 мл 25 г K_2HPO_4 и 25 г KH_2PO_4 ; раствор Б содержит в 250 мл 0,5 г $MgSO_4$, 0,5 г $NaCl$, 0,5 г $FeSO_4$ и 0,5 г $MnSO_4$.

Для приготовления основной среды на 50 пробирок ингредиенты берутся в следующих соотношениях: глюкозы — 5 г; раствора цептона — 50 мл; раствора цистина — 12,5 мл; дрожжевого экстракта — 10 мл; раствора солей А — 2,5 мл; раствора солей Б — 2,5 мл; pH среды доводят 1 н. $NaOH$ до 6,6—6,8 и объем смеси доводят до 250 мл. Концентрация полученной среды в 2 раза выше концентрации среды, на которую производят посев. Нужную концентрацию среды получают добавлением испытуемых вытяжек или воды.

Стандартный раствор рибофлавина (40 μg в 1 мл) — тот же, что и при химических определениях; его разводят водой так, чтобы конечная концентрация раствора была равна 0,1 μg в 1 мл.

Рабочий раствор готовят каждый раз перед постановкой опыта.

Подготовка образцов

Для определения рибофлавина в трех образцах необходимо иметь 45 обычных химических пробирок. Во все пробирки вносят по 5 мл основной среды, 16 пробирок служат для получения стандартной кривой; для этого в две пробирки добавляют по 5 мл воды (нулевая проба), в следующие пробирки вносят возрасташие количества рабочего раствора рибофлавина: 0,5, 1,0, 1,5, 2, 2,5, 3 и 5 мл. Во всех пробирках объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации рибофлавина берут две пробирки. Таким образом получают стандартный ряд пробирок с концентрацией рибофлавина в 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 и 0,05 μg в 1 мл.

Для опытного образца берут 10 пробирок и также вносят все возрастающие количества растительной вытяжки: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл. Объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации берут по две пробирки.

Все пробирки стерилизуют в автоклаве в течение 15—20 мин. при 1 атм и охлаждают до комнатной температуры. Затем в каждую пробирку вносят по 2 капли посевного материала, приготовленного, как указывалось выше, и помещают пробирки в терmostat при 37° на 48 часов. После этого содержимое каждой пробирки выливают в колбочку, пробирку несколько раз

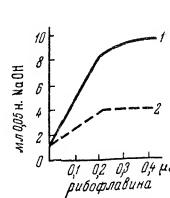


Рис. 1. Образование молочной кислоты при различных сроках выращивания культуры *Lactobacillus casei* (1) и 24 часа (2)

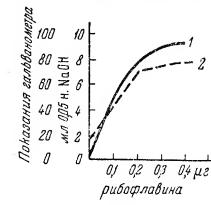


Рис. 2. Стандартные кривые для рибофлавина, полученные титрованием молочной кислоты (1) и определением мутности (2)

промывают водой, которую сливают в ту же колбочку, и обработавшуюся молочную кислоту титруют 0,1 н. $NaOH$ с бромомолблau в качестве индикатора.

Очень важно до начала опыта тщательно установить необходимую величину pH основной среды и испытуемых вытяжек, иначе могут быть получены неправильные результаты. Обычно на титрование пульевой пробы должно пойти не более 1,0—1,5 мл 0,1 н. $NaOH$. На титрование пробирок с высокими концентрациями рибофлавина (0,025—0,03 μg) должно быть использовано около 10—12 мл $NaOH$ (рис. 1). Результаты титрования параллельных проб не должны расходиться больше чем на 0,2 мл. По данным титрования опытных пробирок находят содержание в них рибофлавина путем простой интерполяции стандартной кривой. Результаты, выходящие за пределы стандартной кривой (0,005 и 0,025 μg на 1 мл), отбрасывают; полученные величины сравнивают для того, чтобы убедиться, сходятся ли они при различных разбавлениях испытуемого образца. Если максимум отклонений не превосходит 20%, из всех величин выводят среднее. Для получения

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биологии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

А. А. ДМИТРОВСКИЙ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАТИОНТА СДВ-3
ПРИ ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОМ МЕТОДЕ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА В₁**

Флуориметрический метод определения витамина В₁ является точным, чувствительным, быстрым и потому наиболее распространенным [1, 2, 3, 4]. Основное препятствие для еще более широкого использования этого метода — это дефицитность адсорбента декалько, искусственного алюмоциликата, с помощью которого отделяют мешающие определению примеси. Ввиду трудности стандартизации этого адсорбента при лабораторном изготавлении [5, 6], мы исследовали другие способы отделения мешающих при определении витамина В₁ примесей. Для этого испытывалось разрушение примесей путем погревания вытяжек, подкисленных соляной кислотой до pH = 2, с последующей экстракцией примесей изобутиловым спиртом, как это описано Г. Д. Елисеевой [7]. С этой же целью мы применяли способ распределительной экстракции по А. В. Труфанову и В. А. Кирсановой [8], для чего витамин В₁ экстрагировали из вытяжек фенолом, а при добавлении серного эфира переводили в эфир. Наконец, отделение примесей было испытано на спиринатах и природных адсорбентах, а также на катионитах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Опыты проводили с растворами чистого витамина В₁ и с вытяжками, приготовленными по методу, принятому в нашей лаборатории [9]. Вытяжки получали кипячением 5 г материала с 75 ± 0,1 н H₂SO₄ течение 30 мин., к ним, после центрифугации, для освобождения связанных форм витамина добавляли ферментный препарат. После выдерживания при 37° в течение

Использование катионита СДВ-3

101

12 час. вытяжки отфильтровывали, доводили до объема 100 мл и подвергали дальнейшей обработке.

**Освобождение от примесей по Елисеевой [7] и по
Труфанову и Кирсановой [8]**

При испытании данных способов в качестве объектов были взяты богатые примесями вытяжки из ржаных сухарей, полученная, как указано выше, и моча человека. Для освобождения от примесей вытяжку и мочу обрабатывали по Елисеевой или Труфанову и Кирсановой, делили на две части, к одной из них добавляли только щелочь, а ко второй, кроме того, феррицианид для окисления витамина В₁ в тиохром. Обе части обрабатывали изобутиловым спиртом, флуоресценцию тиохрома в изобутиловом спирте измеряли после отделения изобутилового спирта от водноцелочного слоя. Таким образом получали два отсчета гальванометра флуорометра — для раствора без окисления (указывает содержание примесей) и для раствора с окислением (примеси + тиохром).

Таким же образом испытывали для сравнения вытяжки, полученные с предварительной обработкой декалько [9] и без всякой обработки; полученные результаты представлены в табл. 1.

В таблице первые цифры означают показания гальванометра для окисленных феррицианидом проб, вторые цифры — показания неокисленных проб, а разность между ними характеризует интенсивность флуоресценции, обусловленную витамином В₁. Для сопоставления следует сказать, что флуоресценция

Таблица 1

Сравнение эффективности отделения примесей различными методами

Наименование объекта исследования	Отсчеты по флуорометру			
	с обработкой			
	без обработки	декалько	по Елисеевой	по Труфанову и Кирсановой
Сухари ржаные . . .	42-29-43	34-40-24	39-22-17	29-16-43
Моча	50-50=0	50-14=36	38-45=3	27-19=8

укусно-нитрата калия. Колбу закрывают ватной пробкой и выдерживают в термостате при 37° в течение 12–16 часов. Охлаждив раствор, доводят его объем до 50–100 мл дистиллированной водой, перемешивают, фильтруют и берут для адсорбции 10–20 мл вытяжки.

Далее ход определения свободного и общего тиамина одинаков. Разница между обеими определениями дает величину связанныго тиамина (окарбоксилазы¹).

Произведение адсорбции тиамина. Для проведения адсорбции употребляют длинную трубку (27 см), спаянную из трех трубок различного диаметра: первая — длиной 9 см, диаметром 2,5 см; вторая, средняя — длиной 15 см, диаметром 0,7 см; третья, нижняя трубочка капиллярная — длиной 3 см, диаметр капилляра 1 мм (см. рис. 2).

В нижнюю часть второй трубки помещают комочек стеклянной ваты таким образом, чтобы подовая лежала поверх отверстия, и насаживают стеблик адсорбента высотой 6 см в случае применения «декальса». При использовании других адсорбентов высота стеблика может быть больше или меньше в зависимости от адсорбционных свойств адсорбента. Стеблик адсорбента промывают 10 мл 3%-ной уксусной кислоты, после чего в трубку вводят от 10 до 20 мл исследуемой вытяжки. После того как связность прошла через адсорбент, его промывают трехкратным пропусканием дистиллированной воды (каждый раз по 10 мл).

Тиамин с адсорбента вытапливают горячим 25%-ным раствором KCl 0,1 н. НСЛ. Жидкость собирают в градуированный цилиндр до тех пор, пока ее объем не будет равен 25 мл.

Полученное тиохрома. По 5 мл полученного раствора изменяют в две маленькие цилиндрические делительные вороночки, в первую прибавляют 3 мл смеси 0,04%-ного раствора феррицианида в 45%-ном растворе NaOH, перемешивают и прибавляют 12 мл изобутилового или изоамилового спирта. Во вторую делительную воронку, служащую контрольной, прибавляют 3 мл 15%-ного раствора NaOH (без феррицианида), перемешивают и прибавляют 12 мл изобутилового спирта.

¹ Приготовленные указанными выше способами вытяжки могут быть использованы для определения рибофлавина, при этом в вытяжке без ферментов определяют свободный и мононуклеотидный рибофлавин, а в вытяжке с ферментом суммарно — флавин-аденин-динуклеотид, мононуклеотид и свободный рибофлавин (прочно связанный с белком рибофлавин определять не будет). Подробно о методе определения рибофлавина см. в статье К. Л. Новодницкой, И. В. Зандовой и Е. П. Смирновой, помещенной ниже [5].

Обе вороночки встряхивают в течение 1,5 мин. После отстаивания сливают нижний водный слой и отбрасывают его. В изобутиловый спирт добавляют около 2 г Na₂SO₄, встряхивают и просветленный раствор употребляют для флуориметрии. Этот раствор должен быть совершенно прозрачным, в противном случае следует добавить Na₂SO₄, дать постоять, слить раствор и перенести в кювету. Параллельно проводят окисление стандартного раствора тиамина, для чего в две делительные вороночки берут по 1 мл рабочего раствора тиамина, содержащего 1 мг этого витамина, добавляют по 4 мл воды и в одну вносят щелочной раствор феррицианида, а во вторую — щелочной раствор без феррицианида, производят окисление тиамина и извлечение тиохрома, как описано выше.

Флуорометрия. Для количественного определения тиохрома используют флуориметр, снабженный чувствительным гальванометром, специфическим светофильтром с максимумом поглощения около 390 мкм и одинаковыми пробирками или кюветами из нефлуоресцирующего стекла¹.

В каждую из взятых пробирок (или кювет) помещают около 8 мл испытуемых окисленных и неокисленных изобутиловых растворов, а также изобутиловые растворы окисленного и неокисленного стандартного раствора тиамина и производят определение интенсивности флуоресценции по шкале гальванометра.

Расчет производят по следующей формуле:

$$\frac{(x-y)-1-r}{(x-y)-p-r_1-5} = \mu\text{г тиамина в 1 г образца, где:}$$

x — показания флуорометра для испытуемого образца с окислителем;

y — показания флуорометра для испытуемого образца без окислителя;

r — показания флуорометра для стандартного раствора с окислителем;

*r*₁ — показания флуорометра для стандартного раствора без окислителя;

1 — 1 мг тиамина в 12 мл изобутилового спирта;

p — навеска образца (в г);

c — объем (в мл), до которого была доведена опытная смесь после кислотного или кислотного и ферментативного гидролиза;

¹ В случае отсутствия флуориметра определение можно производить визуально в ультрафиолетовом свете, детектировав опытные вытяжки раствором тиохрома до флуоресценции стандартического раствора окисленного тиамина (подробно см. Мурри [2]).

Таблица 1
Содержание тиамина в различных образцах при его определении с применением адсорбции и без нее ($\mu\text{г на 1 г материала естественной влажности}$)

Исследуемый материал	Показания гальванометра флуориметра		Содержание тиамина		Показатель отпадения соединения с адсорбентом при определении с адсорбцией и без нее (адсорбция на единицу без адсорбции)	
	без адсорбции		с адсорбцией			
	израсходованная вытяжка	использованная вытяжка	израсходованная вытяжка	использованная вытяжка		
Пшеница (зерно) . . .	57	7	5	6	4,7 5,3 112	
Хлеб ржаной (сухаря) .	37	33	32	13	0,35 2,40 600	
Виноград . . .	27	7	36	4	1,6 3,77 235	
Фасоль 1 семена	45	36	18	7	1,54 2,44 137	
Хлопчатник (проростки)	12	9	12	5	0,28 0,82 292	
Багрянник (коричневый) .	12	11,5	12	6,5	0,06 0,65 1100	
* (сердцевина)	21	7	13	8,0	1,40 1,06 96	

рабочего раствора 1 мл стандартного раствора доводят водой до 100 мл; готовят рабочий раствор в день определения. Такой раствор содержит 1 $\mu\text{г}$ тиамина в 1 мл.

2) 0,1 н. H_2SO_4 .

3) 2,5 М раствор уксусно-кислого натрия. Растворяют 340 г CH_3COONa в 1 л воды.

4) 25%-ный раствор хлористого калия. Растворяют 250 г KCl в воде, добавляют 8,5 мл концентрированной HCl в объем доводят до 1 л.

5) 25%-ный раствор хлористого калия в воде (для обработки адсорбента).

6) 45%-ный раствор NaOH .

7) 1%-ный раствор $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ готовят в день употребления. Для очищения вытяжек используют 0,04%-ный раствор $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ и 15%-ный растворе NaOH , для чего 4 мл исходного раствора вносят в 96 мл 15%-ного раствора NaOH . Щелочной раствор $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ годен для употребления в течение 4 час. после приготовления.

8) Сернокислый натрий безводный.

9) Ледянная уксусная кислота, разводят до концентрации 3%.

10) Адсорбент типа пермутита. Пермутит кипятят 15 мин. с десятикратным количеством 3%-ной уксусной кислоты¹.

11) Изобутиловый или изомасличный спирт. Необходимо проверить спирт на отсутствие флуоресценции (допустимо отклонение стрелки гальванометра флуориметра не более чем на 4–5 делений). Если спирт флуоресцирует, его следует перегнать в приборе со стеклянными шлифами. Если после перегонки флуоресценция не исчезает, следует его обработать 10–30 г активированного угля на 1 л спирта и вновь перегнать (не допускается использование резиновых пробок).

Ферментные препараты: клара (патентованный ферментный препарат) или ферментный препарат из мицелия *Penicillium*. Мицелий, отмытый от лишней влаги лабораторным пресом до содержания 25–30% сухих веществ, высушивают при температуре не выше 45°. Мелко растирают и хранят в сухом и темном месте. Перед внесением в вытяжку следует ферментный препарат растирать в ступке с небольшим количеством раствора уксусно-кислого натрия. Рекомендуется проводить определение количества тиамина в ферментных препаратах и, если это требуется, вычитать из найденного тиамина то его количество, которое писалось с ферментным препаратом. Обычно этого не приходится делать, так как содержание тиамина в препаратах не превосходит указанной величины.

П с д г о т о в к а о б р а з а . 5–10 г образца помещают в ступку с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и тщательно растирают. Растигнутую массу переносят в колбу, добавляя 0,1 н. NaOH так, чтобы общий объем кислоты был равен 40–70 мл. Колбу помещают на миниатюрную водяную баню и часто встряхивают, чтобы образец не пристал к стенкам колбы. Экстракцию ведут 45 минут. Затем колбу охлаждают до 50°, добавляют 2,5 М раствор уксусно-кислого натрия до рН 4,5–5,0.

При определении свободного тиамина жидкость доводят до определенного объема, фильтруют и берут для адсорбции 10–20 мл вытяжки.

При определении общего содержания тиамина после доведения рН вытяжки до 4,5–5,0 добавляют ферментный препарат (30 мг на 1 г сухого вещества взятой вытяжки). Ферментный препарат следует предварительно растереть с раствором

¹ При проведении работы мы использовали импортный адсорбент «декалькс», о возможности замены «декалькс» отечественным адсорбентом см. статью А. А. Дмитриевского [4].

Таблица 1

Содержание тиамина в различных образцах при его определении с применением адсорбции и без нее (в угле на 1 г материала естественной влажности)

Исследуемый материал	Поглощания гальванометра флюориметра				Содержание титана	
	без адсорбции	с адсорбцией	без адсорбции	с адсорбцией	без адсорбции	с адсорбцией
	окисленная натрия	неокисленная натрия	окисленная натрия	неокисленная натрия		
Инхибиция (зерно)	57	7	5	6	4,7	5,3
Хлеб ржаной (сухаря) . . .	37	33	32	13	0,35	2,10
Винка { семена	27	7	35	4	1,6	3,77
Фасоль { семена	46	36	18	7	1,54	2,11
Хлопчатник (проростки) . .	42	9	12	5	0,28	0,82
Картофель (пожуро) . . .	42	11,5	12	6,5	0,06	0,65
" (есфирцевина)	21	7	13	8,0	1,10	1,06

рабочего раствора 1 мл стандартного раствора доводят водой до 100 мл; готовят рабочий раствор в день определения. Такой раствор содержит 1 μg тиамина в 1 мл.

2) 0,1 n. H₂SO₄.

3) 2,5 М раствор уксусно-кислого натрия. Растворяют 340 г CH_3COONa в 1 л воды.

4) 25%-ный раствор хлористого калия. Растворяют 250 г KCl в воде, добавляют 8,5 мл концентрированной HCl и объем доводят до 1 л.

5) 25%-ный раствор хлористого калия в воде (для обработки адсорбента).

6) 15%-ный раствор NaOH.

7) 1% -й раствор $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ готовят в день употребления. Для определения вытяжки используют 0,04%-й раствор $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в 15%-ном растворе NaOH , для чего 4 мл исходного раствора вносят в 96 мл 15%-ного раствора NaOH . Щелочной раствор $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ хранят для употребления в течение 4 час. после приготовления.

8) Сернокислый натрий безводный.

9) Недипая уксусная кислота, разводят до концентрации 3%.
 10) Адсорбент типа пермутита. Пермутит кинятся 15 мин. с десятикратным количеством 3%-ной уксусной кислоты¹.

о десктическом количестве эф-^о-ной уксусной кислоты.

11) Изобутиловый или изопропиловый спирт. Необходимо проверить спирт на отсутствие флуоресценции (допустимо отклонение стрелки гальванометра флуорометра не более чем на 4—5 делений). Если спирт флуоресцирует, его следует перегнать в приборе со стеклянными шлифами. Если после перегонки флуоресценция не исчезает, следует его обработать 10—30 г активированного угля на 1 л спирта и вновь перегнать (не допускается использование резиновых пробок).

Ферментные препараты: изопраза (нативогидролизованный ферментный препарат) или ферментный препарат из мышцей Ренеци-Ним. Мицелий, отжатый от анионной влаги лабораторным прессом до содержания 25–30% сухих веществ, высушивается при температуре не выше 45°. Мелко растергают и хранят в сухом темном месте. Перед внесением в выстижку следует ферментный препарат растерпать в ступке с небольшим количеством раствора уксусно-кислого патрия. Рекомендуется проводить определение количества тиамина в ферментных препаратах и, если оно превосходит 0,1 г на 1 г препарата, вычитать из найденного тиамина то его количество, которое внесено с ферментным препаратом. Обычно этого не требуется делать, так как содержание тиамина в препаратах не превосходит указанной величины.

Подготовка образца 5—10 г образца помещают в ступку с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и тщательно растирают. Растворенную массу переносят в колбу, добавляют 0,1 н. H_2SO_4 так, чтобы общий объем кислоты был равен 40—70 мл. Колбу помещают на кипящую водяную баню и частично втягивают, чтобы образец не пристал к стенкам колбы. Экстракцию ведут 45 минут. Затем колбу охлаждают до 50°, добавляют 2,5 М раствор уксусно-кислого патрия до рН 4,5—5,0.

При определении свободного тиамина жидкость доводят до определенного объема, фильтруют и берут для адсорбции 10—20 мл вытяжки.

При определении общего содержания тиамина после добавления рН вытяжки до 4,5—5,0 добавляют ферментный препарат (30 мг на 1 г сухого вещества взятой пшеницы). Ферментный препарат следует предварительно растворить в растворе

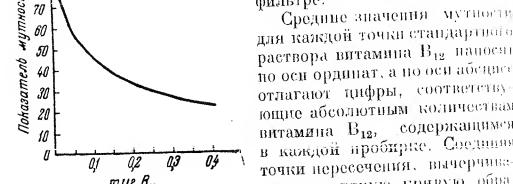
¹ При проведении работы мы использовали импортный адсорбент «декальц»; о возможности замены «декальца» отечественным адсорбентом см. статью А. А. Чистяковского [3].

стандартную кривую. В среднем за неделю один сотрудник может провести две серии опытов, т. е. испытать 20—25 об разцов.

Учет интенсивности роста *B. coli*

После выдерживания пробирок в термостате содержимое каждой пробирки взбалтывают, затем заполняют цветную фазоэлектроколориметра ФЭК или нефелометра (результаты измеряются одинаковые) и измеряют мутность. При использовании фтооэлектроколориметров отсчеты делаются при синем светофильтре.

Средние значения мутности для каждой точки стандартного раствора витамина B_{12} наносят по оси ординат, а по оси абсцисс откладывают цифры, соответствующие абсолютным количествам витамина B_{12} , содержащимся в каждой пробирке. Соединяя эти точки пересечений, получают стандартную кривую, образец которой дается на приведенном рисунке.



Стандартная кривая при испытании растворов чистого витамина B_{12} с *Bacillus coli*

Содержание витамина B_{12} определяется отдельно для каждого пробирки испытуемого образца путем интерполяции, а именно — нахождения на стандартной кривой той точки, которая соответствует данной степени мутности и отсчета по оси абсцисс соответствующего количества витамина B_{12} . Те данные, которые не укладываются в стандартную кривую, отбрасываются, из тех же, которые уложились, высчитывают количество витамина B_{12} в исходном образце и берут среднюю величину не менее, чем из 3—4 параллельных. Если наблюдается рост микробов в контрольных пробирках с разрушенным витамином B_{12} , то его количество, соответствующее данному росту, вычитают таким же образом, эту величину вычитают из ранее найденной величины содержания витамина B_{12} . Как показал опыт работы, случаи, когда надо было бы вводить поправку, очень редки.

В табл. 2 приведен пример определения витамина B_{12} в рогатом скоте.

Микробиологический метод определения витамина B_{12} 181Таблица 2
Пример определения витамина B_{12} в мясе рогатого скота
(измена 24, разведение 1:5000)

№ пробирки	Количества витамина, добавленного в пробирку в мкг	Наползает из мутности в пробирке	Обнаружено витамина B_{12} в мясе		
			в 1 мл наполнен	в 1 г мяса	в 1 г наполнен
4	0,5	54	0,035	0,090	450
2	0,5	52	0,050	0,100	500
3	1,0	53	0,087	0,187	635
4	1,0	52,5	0,090	0,190	550
5	1,5	37	0,125	0,083	315
6	1,5	37	0,125	0,083	315
7	2	33	0,160	0,080	400
8	3	22	0,275	0,091	555
9	3	23	0,255	0,088	440
10	5	16	0,380	0,070	350

В среднем 432,5

При вычислении среднего значения содержания витамина B_{12} в 1 г результате, полученные во второй и десятой пробирках, были отброшены как далеко отстоящие от средней величины.

Выводы

1. Используясь специальными выведченными питтами *Bacillus coli*, дефектными в отношении биосинтеза витамина B_{12} , подобран и испытан микробиологический метод определения витамина. Для определения достаточно наличия 2—4 миллиграммов (мкг) витамина B_{12} во взятой плавске испытуемого образца.

Литература

1. Schorff M. S. Unidentified growth factors for *Lactobacillus lactis* in refined liver extracts. — J. biol. chem., 1939, 169, 455.
2. Райт Л., Скелтон Э., Рубин С. и Д. Риттер. Микробиологические методы определения витаминов. С. 51. «Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот». Изд. ИИ, 1954.
3. Schorff M. S., Кинг У. Т., Купер У. М., Скотт У. М. Factors influencing the microbiological assay of vitamin B_{12} . Characterization of a fraction having growth stimulating activity for *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus leichmannii* in the vitamin B_{12} assay. Symposium sur la biochimie de l'hématoïde. Paris, 1952.
4. Петров А. Ф. и Слюсарь Н. Г. Живая *B. coli*, требующая витамина B_{12} . — ДАН, т. XCV, № 2, 395, 1955.

Подготовка испытуемого образца для анализа

В природных материалах основная часть витамина B_{12} находится в связанным с белком виде и является микробиологически неактивной до тех пор, пока не будет разрушен связь путем автоклавирования, кипячения или протеолиза. Табл. 4 дает представление о степени освобождения витамина B_{12} при различного рода обработке материала.

Таблица 4

Содержание витамина B_{12} в печени, определяемое при различной обработке материала (в мкг на г сухого вещества)

Образец	Содержание витамина B_{12} при				
	автоклавии на ходу	автоклавии в течение 24 часов при 37°	кипячении в течение 24 часов при 37°	кипячении в течение 30 мин	автоклавии в течение 10 мин при 120°
Печень крупного рогатого скота	263	737	1070	1100	1130
То же	0	884	—	1150	1720
" "	450	620	1200	1160	1400
Печень кита	—	—	600	570	590
" кролика	75	—	—	900	1000

Приводим ниже описание подготовки испытуемого образца путем автоклавирования.

1—2 г образца тщательно измельчают и суспендируют в 50 мл дистиллированной воды. Для лучшего отделения витамина B_{12} от белка, а также для его стабилизации, особенно некоторых его форм, например витамина B_{12a} (оксенофталминина), добавляют 200—400 мкг KCN, pH суспензии затем доводят до 5 добавлением 1—2 капель 1 н. HCl и суспензию автоклавируют в течение 10 мин. при давлении в одну атмосферу.

После охлаждения содержимое переносят в 100 мл мерную колбу, добавляют 0,5 н. раствор NaOH до pH 6,8 и воду до метки. Смеся фильтруют, часть фильтрата разводят до такой концентрации, чтобы в 1 мл было приблизительно 0,05—0,1 мкг витамина B_{12} . Если не известно даже приблизительно, каково содержание B_{12} в исследуемом образце, приходится разводить

Микробиологический метод определения витамина B_{12} 179

смесь несколько раз и испытывать каждую из проб. Материалы, содержащие большое количество яичка, следует предварительно обезжиривать путем экстракции сиропом эфиром (например, нечех трески).

Изготовление контрольного образца

В испытуемом образце иногда могут содержаться значительные количества метионина или гистидина, к которым чувствительны применяемые нами штаммы. Поэтому необходимо проводить контрольное определение в опытной вытяжке, в которой витамин B_{12} разрушен. Для этого 5 мл первоначального фильтрата смешивают с 5 мл 0,2 н. NaOH и кипятят в течение 30 мин. с обратным холодильником. После охлаждения раствор нейтрализуют добавлением 1 н. раствора HCl и разводят до такой же степени, как и в опыте с неразрушенным витамином B_{12} .

Постановка опыта

Проведение опыта состоит из двух частей — получение стандартной кривой для чистого витамина B_{12} и испытание исследуемого образца.

В 27 широких пробирок одинакового размера (1,7×18 см) пишет по 5 мл опытной среды, различные количества разбавленного раствора витамина B_{12} (0—0,5—4,0—4,5—2,0—2,5—3,0—3,5—4 мл), затем добавляют воду в каждом случае до 10 мл. На каждую градацию витамина B_{12} , в том числе и на опыты без витамина B_{12} , приходится по 3 пробирки.

При испытании исследуемого образца поступают точно таким же образом с той лишь разницей, что вместо стандартного раствора витамина B_{12} пишут те или иные количества опытной вытяжки. Обычно берут 10 пробирок по 2 пробирки на каждую повторность. Можно рекомендовать вносить следующие количества опытной вытяжки: 0,5—4,0—4,5—3,0—4 мл. Кроме того, ставят 3 пробирки с контрольной вытяжкой, в которой витамин B_{12} разрушен. В пробирки вносят 2, 3 и 4 мл этой вытяжки.

После разливания пробирки автоклавируют 20 мин. при давлении 0,5 атм., охлаждают, засевают одной каплей бактериальной взеси и ставят в терmostat на 24 часа при 37°.

Опыт показал, что одновременно целесообразно ставить на испытание 10—12 образцов, имея при этом стопи пробир-

гистидину. Кроме того, в нашем распоряжении имеется штамм *Escherichia coli*, чувствительный к витамину B₁₂ и метионину.

Чувствительность к метионину и гистидину у указанных штаммов выражена значительно слабее, чем к витамину В₁₂, и это действие может проявляться лишь при концентрациях в несколько десятков тысяч раз превышающих таковые для В₁₂. Поэтому в практических условиях редко приходится прибегать к постановке контрольных опытов с разрушением витамина В₁₂ (см. ниже). Этую предосторожность надо, однако, иметь в виду при неподготовленности материалов с низким содержанием витамина В₁₂, когда приходится иметь дело с сравнительно мало разведенными вытяжками, в которых концентрация метионина может оказаться высокой.

Все три патамма имеют то большее преимущество, что они растут на простой минеральной среде с добавлением глюкозы и развиваются в два раза быстрее, чем *L. lactis* Dörrer, что значительно упрощает и ускоряет всю работу.

Ниже приведено описание микробиологического метода определения витамина B₁₂, который был нами подобран и испытан на различного рода объектах.

Выращивание культуры

Культуру выращивают на склоненной агаровой среде и хранят в холодильнике. Раз в месяц культуру пересевают на свежую агаровую среду и после пересева выдерживают 24 часа в термостате при 37° . Состав агаровой среды на 100 мл:

- Казепиевый кислотный или ферментативный гидролизат (в расчете на сухое вещество) 0,6
- Калий фосфорниоксидный двузамещенный (K_2HPO_4) 20 м
- Железо сернокислое ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) 0,5
- Магний сернокислый ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 20
- Л-аспарагин 20
- Глицинерин 200
- Агар-агар 1,5
- Витамины В₁₂ 10⁻⁶

Составные части 1—4 растворяют последовательно в дистилированной воде. Аспараги растворяют отдельно с прибавлением нескольких капель 1 н. HCl при слабом подогревании и затем приливают к вышеуказанному раствору, pH доводят до 7,0, добавляют глицерин, агар-агар и воду до 100 мл. После подогревания на водяной бане до растворения азота витамина B₁₂, смесь тщательно перемешивают, разливают

пробирки по 5 мл и стерилизуют в автоклаве в течение 15 мин. при давлении в одну атмосферу.

Приготовление опытной среды

Состав опытной среды на 1 л:	
Калий фосфорномолибдат двумазансеничный $K_3[Fe(PO_4)_2]$	7 г
Калий феофторомолибдат одомазансеничный $K_3[FeO_4]$	3 г
Натрий лимоннокислый $C_6H_5O_7Na_2 \cdot 7H_2O$	0,5 г
Магний сернистый $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 г
Аммоний сернокислый $(NH_4)_2SO_4$	1,0 г
Глюкоза	2 г
Натрий хлористый ($NaCl$)	0,5 г
Калий циннатный (KCN)	1 мг

Ингредиенты растворяют последовательно в дистиллированной воде. Цианистый калий добавляют в виде раствора, в 1 мл которого содержится 0,05–0,1 мг. Конечное значение pH среды должно лежать в пределах 6,8–7,0.

Приготовление посевного материала

За сутки до засева опытных пробирок готовят посевной материал. Для этого в две пробирки берут по 5 мл указанной выше среды и 5 мл стандартного раствора витамина В₁₂, используемого для получения стандартной кривой (см. ниже). В 1 мл такого раствора содержится 0,0011 μ г витамина В₁₂. Смесь автоклавируют при давлении 0,5 атм в течение 20 мин, и по охлаждению засыпают культурой с агара. Засеянные пробирки ставят в термостат при 37° в 20–24 часа. Затем бактериальную суспензию переносят в стерильные центрифугируемые пробирки и центрифugируют в течение 10 мин. (при 2500 об./мин.). Жидкость сливают, в осадок добавляют 10 мл 0,9%-ного раствора NaCl и клетки вновь отделяют центрифугированием. Осадок суспензируют в 30–50 мл 0,9%-ного раствора NaCl и используют для засева опытных пробирок, причем вносят по одной капле на пробирку.

Измерение концентрации стандартного раствора витамина В₁₂

Для получения калибровочной кривой используют водный раствор витамина В₁₂, в 1 мл которого содержится 0,01 мг. Раствор хранят в холодильнике в склянке с притертой пробкой под слоем золотухи. В день опыта делают второе разведение до содержания 0,0001 мг витамина В₁₂ в 1 мл (в 100 раз).

12. Variations needed

Л и т е р а т у р а

- Спелл Э. Микробиологические методы количественного определения витаминов. Сб. статей «Микробиологические методы определения витаминов и аминокислот». ИЛ, 1954.
- Stokstad E. L. R. a. Hutchings B. L. The biological assay of *Lactobacillus casei* factor (Vitamin B₁₂). Biological symposia, v. XII, 1947.

АКАДЕМИЯ НАУК ССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН ССР, Москва

Л. С. КУЧЕРЯ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА В₁₂

Как известно, до 1947 г. не было других методов определения активности печеночных препаратов, применяемых при лечении пернициозной анемии, кроме их испытания на самих больных, что в сильной мере тормозило развитие работ в данной области. Лишь с установлением того факта (Шорб, 1947) [1], что для развития *Lactobacillus lactis* Дюгнес необходим какой-то неидентифицированный термоустойчивый фактор, присутствующий в указанных препаратах, а рост бактерий находится почти в линейной зависимости от степени их активности, был достигнут быстрый успех как в изыскании действующего начала, получившего название витамина В₁₂, так и в разработке других сторон вопроса.

Наиболее рас пространение при определении витамина В₁₂ получили *L. lactis* Дюгнес, *L. leichmannii*, *Escherichia coli* и высоко чувствительная и специфичная аспергилловая *Euglena gracilis* var. *bacillaris*. Сведения литературы по микробиологическим методам определения витамина В₁₂ имеются в работах Райт и др. [2], Шорб и др. [3].

Свою работу мы начали с определения витамина В₁₂ микробиологическим методом, используя при этом *L. lactis* Дюгнес, и убедились в пригодности данной культуры в довольно морщине воспроизводимости результатов. Однако следить за средой (требуется до 29 ингредиентов, в том числе все витамины группы В, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания) и громоздкость постановки опытов побудили нас искальзать другую культуру.

Мы получили от Д. Ф. Петрова два выведенных им вида *Bacterium coli*, отличающиеся к В₁₂ [4]. Один из этих вида (II-3) чувствителен также к мечонину, который может заменять для него витамин В₁₂, а второй витамин (II-4) —

Химический метод для определения аскорбиновой кислоты 189

ПРИЛОЖЕНИЕ
ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА С)

Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее способности обратимо окисляться и восстанавливаться, благодаря наличию в ее молекуле эпидиольной группировки. Специфичным индикатором для определения аскорбиновой кислоты является 2,6-дихлорфенолиндофенол, соединение, обладающее двойным изменением окраски с одной стороны, при изменении рН среды от щелочной к кислой цвет раствора индикатора меняется от интенсивно синего до яркорозового, с другой, окисление соединение имеет окраску, а восстановление — бесцветно. Структура аскорбиновой кислоты, 2,6-дихлорфенолиндофенола и их взаимные превращения представлены ниже.

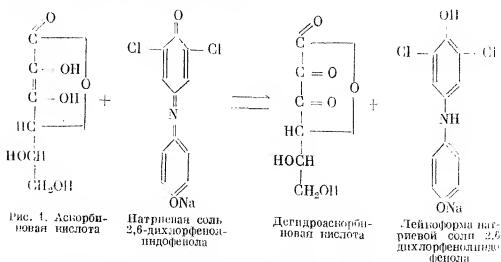


Рис. 1. Аскорбиновая кислота. Натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола. Дегидроаскорбиновая кислота. Леукоформа натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола

Ниже приводится подробное описание методики определения аскорбиновой кислоты, которая может быть применена к большинству растительных и животных тканей. При анализировании окрашенных объектов или объектов, содержащих заметные количества обратимо-окисленной формы аскорбиновой кислоты (обычно объекты, подвергавшиеся той или иной переработке), следует применять ртуть-сероводородный метод В. И. Букина [1] или свинцово-сероводородный метод В. А. Девятинина и В. М. Ношниковой [2].

Первый метод является более точным по сравнению с методом Девятинина, и вытяжки, поступающие на титрование, всегда совершенно бесцветны и прозрачны. Метод Девятинина имеет преимущество перед ртуть-сероводородным в том, что не применяются ядовитые вещества (сулема и уксусная кислота), но вытяжки бывают иногда не полностью обесцвечены и всегда имеют небольшую окраску.

Необходимые реактивы

1) 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. Навеску 0,3 г 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл дистиллированной воды с добавлением 4–2 капель 0,1 н. NaOH, сильно избадывают и оставляют на 1–2 часа (лучше на ночь), истрахивают время от времени. Затем фильтруют и доводят объем до 1 литра. Раствор может быть использован в течение периода до 7–14 дней при хранении в темноте и на ходу.

2) 1%-ная серная кислота (23 мг концентрированной H₂SO₄ с удельным весом 1,19 доводят дистиллированной водой до 1 л).

3) 2%-ная метафосфорная кислота (20 г кристаллической HPO₄ растворяют и доводят водой до 1 л).

4) 2%-ная серная кислота (11,4 мг концентрированной H₂SO₄ с удельным весом 1,84 доводят до 1 л).

5) Аскорбиновая кислота — кристаллическая.

6) 0,001 н. раствор нодата калия (KJ_{0.5}). Отвешивают на аналитических весах 0,3568 г податы, предварительно высушенного в течение 2 часов при 104°, растворяют в воде и доводят объем до 1 л. Такой раствор является 0,01 н. В день определения титра его разбавляют в 10 раз, для чего берут 10 мл исходного раствора и доводят в мерной колбе до 100 мл дистиллированной водой. Исходный раствор устойчив в течение нескольких месяцев при хранении в темноте.

7) Иодистый калий кристаллический (KJ).

8) 1%-ный раствор растворимого крахмала.

Навеску материала, величина которой обусловлена содержанием аскорбиновой кислоты в исследуемом объекте, заливают небольшим количеством 1%-ной НСЛ так, чтобы вся навеска была покрыта кислотой. Навеску берут из расчета, чтобы в 5 мл пред назначенной для титрования вытяжки содержалось 0,15–0,20 мг аскорбиновой кислоты. При взятии навески следует избегать изменения ее положения из железа и меди. Навеску тщательно растирают с крахмальным пюре и фарфоровой ступкой. Добавляют солидную кислоту и навеску переносят в мерную колбу на 100 мл. Затем колбу добавляют 2%-ную метафосфорную кислоту из расчета 1/3 от общего объема и доводят до метки 1%-ной НСЛ. Метафосфорную кислоту добавляют для удаления белков и обезвоживания фильтрования (для животных тканей следует применить 20%ную трихлоруксусную кислоту в трехкратном количестве).

ванийся диниациандный комплекс витамина экстрагируют 4–5 раз малыми порциями (по 2–3 мл) бензилового спирта до прекращения окрашивания очередной его порции. Бензиловый экстракт промывают побольшими порциями насыщенного промывного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (по 3–4 мл) до получения бесцветного промывного раствора. После этого в бензиловому экстракту добавляют равный объем хлороформа и витамин B_{12} экстрагируют небольшими порциями (по 2–3 мл 3–4 раза) водой.

Соединенные водные экстракты сливают от следов бензилового спирта и хлороформа промыванием серным эфиром (2 раза по 4–5 мл), остатки которого удаляют из водного раствора пропусканием через него воздуха или осторожным нагреванием на водяной бане. Раствор слегка подкисливают (уксусной кислотой для перевода диниациандного комплекса фиолетово-красное окрашивание) в цианокобалмине (чисто розовый цвет без фиолетового оттенка) и используют для колориметрирования.

При очистке витамина экстракцией B_{12} бензиловым спиртом в виде диниациандного комплекса и затем водой может быть заменен фенол-хлороформенной очисткой следующим образом.

Кислый водный экстракт, полученный после извлечения витамина B_{12} из бутылкового спирта водой, экстрагируют малыми порциями смеси фенола и хлороформа (1:5) до прекращения окрашивания очередной ее порции (3–5 раз). Фенол-хлороформенные вытяжки соединяют и дважды промывают водой, насыщенной хлороформом. Для перевода витамина B_{12} в водную фазу к фенол-хлороформенной вытяжке добавляют 3-кратный объем хлороформа и витамин B_{12} извлекают малыми порциями воды до прекращения окрашивания очередной порции воды. Водные вытяжки соединяют и промывают серным эфиром для удаления остатков фенола и хлороформа так, как указано выше.

Полученные тем или иным способом водные экстракты должны иметь характеристику для витамина B_{12} розовую окраску. Количество витамина B_{12} определяют спектрофотометрически по измерению поглощения при 548 мкм, пользуясь кюветой толщиной в 1 см, и проводят расчет по формуле:

$$x = \frac{E \cdot V \cdot 10^4}{63},$$

где

x — содержание B_{12} в павеске в микрограммах;
 E — наблюдаемый коэффициент поглощения;

V — объем конечного раствора, в мл;

63 — коэффициент поглощения 1% -ного раствора витамина B_{12} , т. е. при содержании 10000 микрограммов витамина в 1 мл;

10^4 — коэффициент пересчета концентрации витамина B_{12} с процентного содержания на число микрограммов в 1 мл.

При отсутствии спектрофотометра можно пользоваться колориметром, откалиброванным по растворам кристаллического витамина B_{12} с известным его содержанием.

При измерении пользуются зеленым светофильтром.

В заключение следует отметить, что для уверенности в пригодности метода для исследуемого материала, следует рекомендовать его проверку путем определения количества витамина, добавленного к материалу. При работе с печенью, минцем и культуральными жидкостями нам удавалось определить не менее 90–95% добавленного витамина. Количество добавляемого витамина составляло 30–50% от его содержания в анализируемом материале.

ВЫВОДЫ

1. Разработан сравнительно простой химический метод определения витамина B_{12} , позволяющий вести испытания при количестве не менее 50–70 мкг витамина во взятой пищевой материале.

2. Метод основан на экстракции витамина водным раствором цитрата натрия, очистке водных экстрактов от мешающих примесей и спектрофотометрическом или колориметрическом определении витамина в очищенной вытяжке.

ЛITERATURA

1. Boxer G. E., Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . I. Determination of 5,6-dimethylbenzimidazole by colorimetric and fluorometric methods. — Arch. of bioch., 29, (4), 75 (1950).
2. Fanthes K. H. a. Treland D. M. A colorimetric assay method for vitamin B_{12} . — Bioch. J., 46, proc. XXXIV (1950).
3. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . II. The quantitative isolation and colorimetric determination of milligram quantities of cyanide. — Arch. bioch., 30, (2), 372 (1951).
4. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of cobalamin B_{12} . V. A modified procedure for the determination of cobalamin in liver concentrates. — Arch. bioch. a. biophys., 39(2), 281 (1952).
5. Rodkin G. O. a. Taylor R. J. Chemical method for determining vitamin B_{12} . — Analyt. chem., 24, 1455 (1952).
6. Букин В. Н., Арешина Л. Я. и Куценко Й. С. Микро и макрометодика определения витамина B_{12} . Биохимия, 19, вып. 6, 713, 1954.

вавшийся дипианидинный комплекс витамина экстрагируют 4—5 раз малыми порциями (по 2—3 мл) бензилового спирта до прекращения окрашивания очередной его порции. Бензиловый экстракт промывают небольшими порциями насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (по 3—4 мл) до получения бесцветного промывного раствора. После этого к бензиловому экстракту добавляют равный объем хлороформа и витамин B_{12} экстрагируют небольшими порциями (по 2—3 мл 3—4 раза) водой.

Соединенные водные экстракты освобождают от следов бензилового спирта и хлороформа промыванием серным эфиром (2 раза по 4—5 мл), остатки которого удаляют из водного раствора пропусканием через него воздуха или осторожным по дегидратации на водяной бане. Раствор слегка подкисливают (уксусной кислотой для перевода дипианидинного комплекса фиолетово-красное окрашивание) в динатрийбогемии (чисто розовый цвет без фиолетового оттенка) и используют для колориметрирования.

При очистке витамина B_{12} бензиловым спиртом в виде дипианидинного комплекса и затем водой может быть заменен фенол-хлороформенной очисткой следующим образом.

Кислый водный экстракт, полученный после извлечения витамина B_{12} из бутылкового спирта водой, экстрагируют малыми порциями смеси фенола и хлороформа (1:5) до прекращения окрашивания очередной ее порции (3—5 раз). Фенол-хлороформенные вытяжки соединяют и дважды промывают водой, насыщенной хлороформом. Для перевода витамина B_{12} в водную fazu к фенол-хлороформенной вытяжке добавляют 3-кратный объем хлороформа и витамин B_{12} извлекают малыми порциями воды до прекращения окрашивания очередной порции воды. Водные вытяжки соединяют и промывают серным эфиром для удаления остатков фенола и хлороформа, как указано выше.

Полученные тем или иным способом водные экстракты должны иметь характерную для витамина B_{12} розовую окраску. Количество витамина B_{12} определяют спектрофотометрически по измерению поглощения при 548 мкм, пользуясь кюветой толщиной в 1 см, и проводят расчет по формуле:

$$x = \frac{E \cdot V \cdot 10^4}{63},$$

где

x — содержание B_{12} в павеске в микрограммах;
 E — наблюдаемый коэффициент поглощения;

V — объем конечного раствора, в мл;

63 — коэффициент поглощения 1% -го раствора витамина B_{12} , т. е. при содержании 10000 микрограммов витамина в 1 мл;

10⁴ — коэффициент пересчета концентрации витамина B_{12} с процентного содержания на число микрограммов в 1 мл.

При отсутствии спектрофотометра можно пользоваться колориметром, откалиброванным по растворам кристаллического витамина B_{12} с известным его содержанием.

При измерении пользуются зеленым светофильтром.

В заключение следует отметить, что для уверенности в пригодности метода для исследуемого материала, следует рекомендовать его проверку путем определения количества витамина, добавленного к материалу. При работе с печенью, мышцами и культуральными жидкостями нам удавалось определить не менее 90—95% добавленного витамина. Количеству добавляемого витамина составляло 30—50% от его содержания в анализируемом материале.

Выводы

1. Разработан сравнительно простой химический метод определения витамина B_{12} , позволяющий вести испытания при наличии не менее 50—75 мкг витамина во взятой на весах материи.

2. Метод основан на экстракции витамина водным раствором цитрата натрия, очистке водных экстрактов от мешающих примесей и спектроскопическом или колориметрическом определении витамина в очищенной вытяжке.

Литература

1. Boxer G., E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . I. Determination of 5,6-dimethylbenzimidazole by colorimetric and fluorometric methods. — Arch. of bioch., 29, (4), 75 (1950).
2. Fantus K., H. a. Freland D. M. A colorimetric assay method for vitamin B_{12} . — Bioch. J., 46, proc. XXXIV (1950).
3. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . II. The quantitative isolation and colorimetric determination of millimicrogram quantities of cyanide. — Arch. bioch., 30, (2), 372 (1951).
4. Boxer G. E. a. Rickards J. C. Chemical determination of vitamin B_{12} . V. A modified procedure for the determination of cobalamin in liver concentrates. — Arch. bioch. a. biophys., 39(2), 281 (1952).
5. Ruckin G. O. a. Taylor R. J. Chemical method for determining vitamin B_{12} . — Analyt. chem., 24, 1155 (1952).
6. Букин В. Н., Арешкина Л. Я. и Кунева М. С. Микро- и макрометодика определения витамина B_{12} . Биохимия, 19, вып. 6, 713, 1954.

ки до фотолиза как избытка добавленного цианида, так и того цианида, который входит в состав других соединений, находящихся в витамине. Отгонка передко затягивается на несколького суток. Единственным способом устранения этого затруднения явилась предварительная очистка витамина, которую необходимо довести до такой степени, при которой становятся возможным определить витамин на основе его спектральных свойств, что значительно проще, чем определение по оттенению цианиду.

Существенный интерес представляет работа по получению диницидного комплекса витамина B₁₂ [5]. Авторы ее показали возможность избирательного извлечения комплекса бензиловым спиртом и его определения спектрофотометрическим методом. Максимум поглощения диницидного комплекса лежит в длинноволновой части и расположен при 582 мкм ($E^{1\%} = 54$), в то время как для цианокобаламина он расположен при 548 мкм ($E^{1\%} = 63$).

Применив ряд приемов очистки, мы разработали сравнительно простой метод количественного определения ингамии B_{12} (6), который и использовали в течение некоторого времени. В дальнейшем оказалось, что этот метод может быть еще более упрощен и уточнен. Описание этого метода приведено ниже.

Изучение испытуемого материала берут с таким расчетом, чтобы в ней содержалось не менее 50—75 мг B_{12} , например, из почек рогатого скота—200 г, мышц актиномицетов, выращенного с добавлением в среду солей кобальта—100—200 г при взаимности мышц около 80%, культуральной жидкости — в зависимости от условий выращивания микроорганизмов — 0,5—1,0 л и т. д.

Шавеску нечеси измельчают, заливают 5-кратным количеством воды, туда же добавляют 0,25% (вес/объем) натрия и смесь кипятят при помешивании 20–30 мин. После этого в нее добавляют для осаждения белков 50%-ную уксусную кислоту из расчета 1 мл на 100 мл.

Жидкость отфильтровывают и остаток на фильтре промывают одним объемом подогретой воды, подкисленной, как указано выше. Промывные воды вместе с экстрактом поступают для адсорбции.

Минерал агтитомицетов заливают 3-кратным количеством воды, подкисляют до pH 5, добавляют 0,25% нитрита нитрида (вес/объем) и смесь выдерживают при помешивании при температуре 80–90° в течение 20–30 мин. Жидкость отфильтровывают.

а минерал промывают одним объемом подогретой и подкисленной воды.

Взятый объем культивальной жидкости подкислиают до pH 5, добавляют 0,25% нитрита натрия и жидкость выдерживают при 80–90° в течение 20–30 минут.

валом при $60^\circ\text{--}70^\circ$ в течение 20–30 минут.

К подогретым экстрактам добавляют порошкообразный активированный древесный уголь марки А в количестве, до статочном для полной адсорбции витамина. Например, для экстракта из печени – 2%, экстракта из мышцей – 1%, для кукурузной жидкости – 0,75%.

Количество угеля можно варьировать в зависимости от содержания витамина В₁₂, состава экстрактов и адсорбционной активности самого угеля. При работе с низкими обжигатами рекомендуется, поэтому, делать проверку максимального выхода витамина В₁₂, при различных дозировках угеля.

Адсорбцию на угле ведут при непрерывном помешивании в течение 15 мин, при комбинации температура, затем уголь отфильтровывают и промывают холодной водой.

офильтровывают и промывают холодной водой. Для дегорючии витамина В₁₂ используют 10%ный водный раствор бутилового спирта в сочетании со второй низкой обработкой уголью, занимая 20 кратным количеством по отношению к излитой на весах 10%-ного раствора бутилового спирта, в котором перед этим растворено 0,25% натрия хлорида (вес / объем), смесь нагревают при перемешивании до 70°, выдерживают при этой температуре 20 мин. и ведут бутиловый экстракт официнировывают, не давая ему осесть. Уголь на фильтре промывают 4 кратным количеством подогретого водного бутилового спирта, который после промывания присоединяют к основному экстракту.

Водно-бутиловый эмульсия пастылевой серникоцеллюзной замазкой (л. а. з.) и вспениванием бутилового спирта, содержащим витамины В₁₂, введенной. К воде же вода удаляется 2–3% чистого бутилового спирта, смесь хорошо перемешивается и дают отстояться. После отстояния спиртовые масла пропускаются сквозь.

Извлекают криоглиану B_{12} из растворителя, заменяя первичным подкисленной водой (0,01 л. НСl) то превращают окраинами в нейтральную соль.

Водный экстракт подвергается до pH 7, в нем содержатся 0,2% NaCN или KCN и гидрофильные гемоны. Носы этого тела также содержат высвобожденный NH_4^+ , SO_4^{2-} и т. д.

освобождения исследуемых вытяжек и гидролизатов от лигандных веществ, стимулирующих рост данного организма.

Более удобным индикаторным объектом явился *Lactobacillus arabicus* [4], однако для его роста необходим ряд аминокислот.

Путем микробиологических методов определяется либо свободная форма никотиновой кислоты. Определение химически связанных витаминов производят путем автолиза исследуемого образца или его ферментативного гидролиза.

Для количественного определения пантотеновой кислоты мы использовали очень чувствительную и специфическую растворенную реакцию на нее дрожжевого организма *Saccharomyces ludwigii* КМ. Эта культура нуждается в получении извне биотина, витамина В₁ и В₆, никотиновой и никотиновой кислот. 3-Аланин, диоксидиметил-масляная кислота или смесь этих веществ могут заменить для *S. ludwigii* никотиновую кислоту. Описываемый метод значительно проще и доступнее по сравнению с известными методами, в которых используются бактериальные индикаторные культуры — для этих методов требуются весьма сложные питательные среды.

Среды и растворы, необходимые для определения пантотеновой кислоты при помощи *Saccharomyces ludwigii* КМ.

1. Основная среда, на которой поддерживается культура *S. ludwigii* — сусло-агар, приготовленный из сусла (7% Вад) с прибавлением 2% агара.

2. Сахаро-минеральная среда Ридер, в которую засевают индикаторную культуру.

Состав среды Ридер в %:

сахароза	—2 (очищена от примесей активированным углем)
(NH ₄) ₂ SO ₄	—0,3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	—0,07
NaCl	—0,05
Ca(NO ₃) ₂	—0,04
K ₂ PO ₄	—0,1
K ₂ HPO ₄	—0,01

Среду готовят на прокипяченной водопроводной воде и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 минут.

3. Растворы витамина: В₁, В₆ и никотиновой кислоты (1000 мкг/мл).

Раствор биотина (0,25 мкг/мл).

4. Растворы пантотеновой кислоты (на мл — 1000 мкг, 100, 10, 10,1, 0,01 мкг).

Растворы всех витаминов стерилизуют прогреванием в кипящей водяной бане в течение 20 минут.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Составление стандартной кривой

1. Индикаторную культуту за две сутки до опыта пересевают на сусло-агар и выдерживают в термостате при 27°.

Перед опытом из взрослой культуры готовят сильно разведенную суспензию из стерильной водопроводной воды (концентрация дрожжей — около 0,01%).

2. К сахаро-минеральной среде Ридер добавляют витамины В₁, В₆, никотиновую кислоту — по 1000 мкг каждого витамина на 200 мл среды и биотин — 0,25 мкг на 200 мл среды. Среду разливают стерильно по 10 мл в конические колбочки на 50 мл.

3. В колбочки прибавляют все возраставшие количества пантотеновой кислоты (на миллилитр среды — 0,001; 0,002; 0,004; 0,006; 0,008 мкг).

4. Колбы засевают однокапельной приготовленной ранее суспензией и выдерживают в термостате при 27° в течение 40—48 часов.

5. Содержимое колб фильтруют через предварительно заряженные мембранные фильтры № 3, смонтированные на приборе Зейтца. Фильтры с осадком сушат и взвешивают.

6. Вычерчивают стандартную кривую нарастания веса культуры (в мг сухого вещества на 10 мл среды за 40—48 час.) в зависимости от содержания пантотеновой кислоты в среде (в мкг/мл)*.

Определение пантотеновой кислоты

1. Индикаторную культуту и среду готовят так же, как и при составлении стандартной кривой (п. 1 и 2).

2. Исследуемые по содержанию пантотеновой кислоты растворы разводят в добавленной к среде с таким расчетом, чтобы концентрация определяемого витамина в конечном счете находилась между 0,002 и 0,008 мкг/мл среды.

* Введение гидролизата казеина и дрожжевого лизоглюкозата по фону максимальной дозы пантотеновой кислоты не дает дополнительного активирования роста культуры.

освобождения исследуемых вытяжек и гидролизатов от ли-
попидных веществ, стимулирующих рост данного организма.

Путем микробиологических методов определяют свободная форма пантотеновой кислоты. Определение химически связанного витамина производят путем автолиза яичного образца или его ферментативного гидролиза.

Для количественного определения пантотеновой кислоты мы использовали очень чувствительную и специфическую реальную реакцию на нее дрожжевого организма *Saccharomyces ludwigii* K.M. Эта культура нуждается в получении извне биотина, витаминов B₁ и B₆, никотиновой и пантотеновой кислот. β -Аланин, дюксидиметил-масляная кислота и присутствие этих веществ не могут заменить для *S. ludwigii* пантотеновую кислоту. Описываемый метод значительно проще и доступнее по сравнению с известными методами, в которых используются бактериальные индикаторные культуры — для этих методов требуются весьма сложные питательные среды, необходимые для определения пантотеновой кислоты.

Среды и растворы, необходимые для определения наименований кислоты при помощи *Saccharomyces Ludwigi* K.M.

4. Основная среда, на которой поддерживается *S. ludwigii* — сусло-агар, приготовленный из сусла (7° Bal) с прибавлением 2% агара.

— культуру.

Состав сорбты	Ридер в %:
сахароза	— 2 (очищена от примесей активированным углем)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	— 0,3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	— 0,07
NaCl	— 0,05
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	— 0,04
KH_2PO_4	— 0,1
K_2HPO_4	— 0,01

Среду готовят на прокипяченной водопроводной воде и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 минут.

3. Растворы витаминов: В₁, В₆ и никотиновой кислоты (1000 мг/мл), (0,25 мг/мл).

Раствор биотина (0,25 μ г/мл).

4. Растворы пантотеновой кислоты (на 1 ml — 1000 мг, 100, 10, 10,4, 0,04 мг).

Растворы всех витаминов стерилизуют прогреванием в кипящей водяной бане в течение 20 минут.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Составление стандартной кривой

Перед опытом из выросшей культуры готовят спирто-разведенную суспензию на стерильной водопроводной воде (концентрация дрожжей — около 0,01%).

центрации дрожжей — около 0,01%.

2. К саха́ро-минеральной среде Ридер добавляют витамины В₁, В₆, никотиновую кислоту — по 1000 мг каждого витамина на 200 мл среды и биотин — 0,25 мг на 200 мл среды. Среду разливают стерильно по 10 мл в конические колбочки на 50 мл.

3. В колбочки прибавляют все возрастающие количества цианотеновой кислоты (на миллилитр среды - 0,001; 0,002; 0,004; 0,006; 0,008 гг).

4. Капли засевают одной каплей приготовленной ранее суспензии и выдерживают в термостате при 27° в течение 1-2 ч.

5. Содержимое колб фильтруют через предварительно взвешенные мембранные фильтры № 3, смонтированные на прибо-

ре Зейтга. Фильтры с осадком сузят и изменяют веса культуры (им *мг* сухого вещества в 10 мл среды за 40–48 час.) в зависимости от содержания нанотетеновой кислоты в среде (*нг/мл*)^{*}.

Определение пантотеновой кислоты

4. Индикаторную культуру и среду готовят так же, как и при составлении стандартной кривой (п. 1 и 2).

2. Исследуемый на содержание пантотеновой кислоты раствор разводят и добавляют в среду с таким расчетом, чтобы концентрация определяемого витамина в конечном счете находилась между 0,002 и 0,005 мг/мл среды.

* Введение гидролизата казеина и дрожжевого агогензата по фону максимальной дозы иммунотоксичной кистоты не дает дополнительного антивариевого роста гистиотомы.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

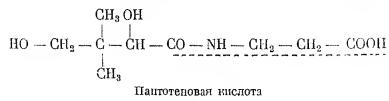
Институт микробиологии АН СССР, Москва

Н. А. ПОМОЩНИКОВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Пантотеновая кислота встречается во всех животных и растительных тканях, преимущественно в связанный форме. В большом количестве она содержится в почечи, почках, и зернах хлебных злаков и в дрожжах.

По своей химической природе пантотеновая кислота представляет собой соединение, построенное из остатков β -аланина и α - γ -дигекс- β - β -диметиласильной кислоты. При получении пантотеновой кислоты путем химического синтеза завершающий этап состоит в конденсации β -аланина с дигексиметиласильной кислотой. Имеющиеся данные указывают на то, что и биологический синтез заканчивается аналогичным образом.



Как видно из приведенной формулы, в состав пантотеновой кислоты входит остаток β -аланина (отмечен пунктиром).

Пантотеновая кислота наиболее устойчива в виде соли натрия и кальция. 1,087 Са-пантотената эквивалентны 1 части пантотеновой кислоты.

В таблице приведены физические и химические свойства пантотеновой кислоты и пантотената кальция.

Оба соединения разрушаются под действием кислот, щелочи и при сильном нагревании.

Ацетат, бензат и дифосфорный эфир пантотеновой кислоты активны в отношении животных, но не используются мочевино-кислыми бактериями и дрожжами.

Микробиологический метод определения пантотеновой кислоты 153

Таблица

Физические и химические свойства пантотеновой кислоты и пантотената кальция

Свойства	Пантотеновая кислота	Пантотенат кальция
Физические признаки	Бесцветная маслообразная жидкость	Белая монокристаллическая соль
Эмпирическая формула	$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{N}$	$(\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_5)_2\text{Ca}$
Молекулярный вес	219,2	470,5
Растворимость:		
в воде	Легко растворяется	Легко растворяется
» этилацетате	То же	—
» ледяной уксусной кислоте	»	—
» эфире	Слабо растворяется	—
» этиловом спирте	То же	—
» бензине	Не растворяется	—
» хлороформе	То же	—

Пантотенол (или пантотеновый спирт) обладает активностью, почти равной активности пантотеновой кислоты. Большинство животных организмов требует для своего роста полной молекулы пантотеновой кислоты. Дрожжи, за некоторыми исключениями, и некоторые штаммы дифтерийных бактерий удовлетворяются молекулой β -аланина. Гемолитические бактерии нуждаются в обязательном присутствии в среде дигексиметиласильной кислоты.

Пантотеновая кислота входит в состав кофермента А (кофермент ацетилтрансферазы), который участвует в углеводном, белковом и жировом обмене, а также в обмене уксусной кислоты. Роль кофермента А, а следовательно, и пантотеновой кислоты в обмене веществ связана с активацией карбоксильных групп, необходимой для осуществления различных биохимических процессов.

Большая часть пантотеновой кислоты в тканях присутствует в форме кофермента А.

Существует несколько методов определения пантотеновой кислоты. В 1937—1939 гг. был предложен метод учета этого витамина по ростовой реакции мышц [1]. Позднее были разработаны более быстрые и точные методы определения пантотеновой кислоты при помощи бактерий и дрожжевых организмов. Использование в качестве индикаторной культуры *Lactobacillus casei* [2, 3] требует предварительного

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

I. Составление стандартной кривой

1. Индикаторную культуру *Saccharomyces ludwigii* КМ пересевают за две сутки до опыта на сухло-агар и выдерживают в термостате при 27°. Перед постановкой опыта готовят сильно разведенную суспензию дрожжей с концентрацией около 0,01% на стерильной водонапорной воде.

2. К среде Ридер добавляют 2% облученного агтоглизата или необходимые для индикаторной культуры витамины (кроме пиридоксина) в количестве 1 мл исходного раствора на 200 мл среды. Среду разливают стерильно в конические колбочки (на 50 мл) по 10 мл в каждую.

3. В колбочки добавляют все возрастающие количества пиридоксина: 0,0001; 0,0005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 1 мг/мл среды.

4. Колбы засевают кашлем разведенной ранее суспензии дрожжей и выдерживают в термостате при 27° в течение 40–48 часов.

5. Содержимое колб фильтруют через предварительно извещенные мембранные фильтры № 3, смонтированные на приборе Зейтца. Фильтры сушат и извещивают.

6. Вычесывают стандартную кривую нарастания веса культуры (в мг сухого вещества) в 10 мл среды за 40–48 час. в зависимости от содержания пиридоксина в среде (в мг/мл).

II. Определение витамина В₆

1. Готовят индикаторную культуру и среду так же, как указано в разделе I (н. 1 и 2).

2. Исследуемые на содержание пиридоксина растворы (биологические жидкости, агтоглизаты, гидролизаты и вытяжки) разводят и добавляют в среду с таким расчетом, чтобы концентрация определяемого витамина в конечном счете находилась между концентрациями, соответствующими 0,0001 и 0,01 мг/мл среды.

3. Колбочки засевают таким же количеством индикаторной культуры, как и при установлении стандартной кривой, и ставят на 40–48 час. в термостат при 27°.

4. По сухому весу культуры, собранной так же, как указано в разделе I, устанавливают, пользуясь стандартной кривой, содержание пиридоксина в миллингре индикаторной

Макробиологический метод определения пиридоксина

151

среды. Зная степень разведения, вычисляют содержание пиридоксина в образце.

5. При определении пиридоксина в новом неисследованном еще субстрате целесообразно подвернуть часть пробы облучению ртутокварцевой лампой и установить, не содержит ли этот субстрат после разрушения пиридоксина каких-либо антиприодексиновых или угнетающих размножение индикаторной культуры веществ. В случае обнаружения таких это должно быть учтено во внимание при окончательных расчетах.

ВЫВОДЫ

1. Разработан простой микробиологический метод определения витамина В₆ (пиридоксина) при помощи дрожжевой культуры *Saccharomyces ludwigii* КМ.

2. Индикаторный дрожжевой организм требует обязательного присутствия в питательной среде или витаминов: тиамина (В₁), биотина, пантотеновой кислоты, никотиновой кислоты и пиридоксина (В₆). Все витамины, за исключением определяемого пиридоксина, могут быть заменены дрожжевым агтоглизатом, предварительно облученным кварцевой ультрафиолетовой лампой.

3. Предложенный метод дает возможность определить от 0,001 до 0,03 мг витамина В₆ в миллингре испытуемого раствора.

ЛITERATURA

- Спенг Е. Vitamin methods. Edit. by P. Gyergy, I, 327, 1950.
- Труфапов А. В. Витаминная группа В₆ (пиридоксин и его производные) и участие их в энзиматических реакциях. — Успехи современной биологии, 25, 19, 1948.
- Иерусалимский Н. Д. Азотные и витаминные питание микробов. — Изд. АН СССР, Москва, 1939.
- Мардинов С. Р. Микробиологические и энзиматические методы количественного определения аминокислот. — Успехи биологической химии (Ежегодник), I, 281, 1950.
- Татиши Е., Ричардс М., Саудри Е. а. Уикс Р. Vitamin content of mouse epidermis during methylcholanthrene carcinogenesis. — J. biol. chem., 163, 675, 1946.
- Уильям Р., Бакин Р. а. Мемфис І. Assay method for pyridoxine. Studies on the vitamin content of tissues I. University of Texas publications, № 4137, 24, 1941.
- Аткин Л., Шульц А., Уильямс В. а. Фрэй С. Yeast-microbiological methods for determination of vitamins pyridoxine, — Ind. eng. chem., Anal. ed., 15, 141, 1943.
- Биркхолдер Р. Vitamin deficiencies in yeasts. — Am. J. botany, 30, 206, 1943.

В случае отсутствия метафосфорной кислоты можно всю работу проводить с одной соляной кислотой. После 10—15-минутного стояния содержимое колбы тщательно перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр.

Из фильтрата берут по 2—5 мл в два стаканчика по 50 мл и титруют из микробюrette (лучше на 5 мл) 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Для расчета берут среднее из 2 титрований.

Расчет производят по формуле

$$\frac{a \cdot n \cdot v}{p \cdot v_1} \cdot 100 = \text{мг \% аскорбиновой кислоты},$$

где:

a — мл 2,6-дихлорфенолиндофенола, использованного для титрования;

n — поправка для перевода мл 2,6-дихлорфенолиндофенола в мл аскорбиновой кислоты;

v — масса материала в г;

v_1 — объем, в которой растворена плавка, в мл;

100 — пересчет на 100 г вещества для получения результатов в мг%.

Титр краски (2,6-дихлорфенолиндофенола) устанавливают по аскорбиновой кислоте по методу С. М. Прокопьева [3]. Для этой цели растворяют несколько мг аскорбиновой кислоты, взятых на глаз 50 мл 2%-ной H_2SO_4 . Берут 5 мл этого раствора и титруют раствором краски до появления слабо розового, не исчезающего в течение 5 мин. цвета. Параллельно титруют 5 мл (взятые той же пипеткой) 0,001 н. раствором KJ_3 до слабо голубого цвета. Перед титрованием податом калия в стаканчик добавляют несколько кристалликов (2—3 мл) KJ и 2—3 капли раствора крахмала. Титрование в обоих случаях ведут из микробюrette.

Титр краски рассчитывают на основании того, что 0,088 мл аскорбиновой кислоты эквивалентны как 0,001 н. раствору податы калия, так и 0,001 н. раствору краски. Имея точно 0,001 н. раствор податы калия и проведя вышеописанное титрование, производят расчет титра.

Титр краски $= \frac{0,088 \cdot a}{b}$ мл аскорбиновой кислоты,

где a — мл KJ_3 , последнее на титрование 5 мл раствора аскорбиновой кислоты;

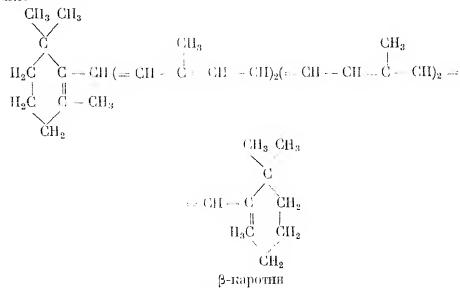
b — число мл краски, последней на титрование 5 мл того же раствора.

Л и т е р а т у р а

1. Букин В. П. Химический метод определения витамина С. Изд. ВАСХНИЛ, 1935.
2. Девятин В. А. и Осиков В. М. Свингово-серводородный метод. Методы определения витаминов, стр. 41. Пищепромиздат, 1951.
3. Прокопьев С. М. К определению аскорбиновой кислоты.— Лабораторная практика, 3, 15, 1941.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРОТИНА (ВИТОРИМИНА А) ПО МУРРИ [1]

Ниже приводится методика суммарного определения изомеров α -, β - и γ -каротина, строение одного из которых (β -каротина) представлено ниже.



В основе метода лежит хроматографическое отделение каротина от сопутствующих пигментов (хлорофилла, ксантофилла, ликоциана и др.), предложенное М. С. Цветом. В случае необходимости определения изомеров каротина в отдельности следует проводить его дальнейшее разделение на адсорбционной колонке, на чем мы останавливаться не будем.

Необходимые реактивы и приборы:

1. Петролейный эфир или легкие фракции бензина.
2. Сернокислый натрий безводный.
3. Оксись магния (MgO) или окись алюминия (Al_2O_3).
4. 0,036%-ный раствор двухромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$); 1 мл такого раствора соответствует 2,08 μg каротина.
5. Колориметр, лучше фотогалогеноколориметр.

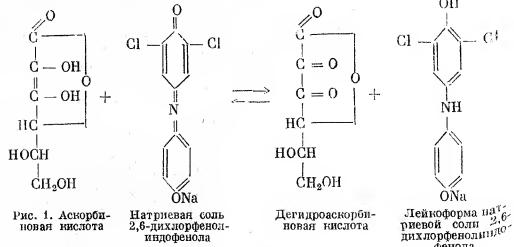
При определении содержания каротина в свежих материалах их предварительная сушка не допускается, так как каротин при этом разрушается.

Исследуемый материал измельчают на мясорубке или терке и тщательно перемешивают, из полученной массы берут 2 плавки (для двух параллельных определений), переносят в фарфоровые ступки и растирают с 4—5-кратным количеством безводного сернокислого натрия для обезвоживания материала. Ввиду того что каротин легко разрушается на воздухе, следует все манипуляции проводить очень быстро. При особо

ПРИЛОЖЕНИЕ

ХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИНА С)

Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее способности обратимо окисляться и восстанавливаться, благодаря наличию в ее молекуле эпидиольной группировки. Специфичным индикатором для определения аскорбиновой кислоты является 2,6-дихлорфенолиндофенол, соединение, обладающее двойным изменением окраски, с одной стороны, при изменении pH среды от щелочной к кислой цвет раствора индикатора меняется от интенсивно синего до яркорозового, с другой, окисленное соединение имеет окраску, а восстановленное — бесцветно. Структурные соединения аскорбиновой кислоты, 2,6-дихлорфенолиндофенола и их взаимные превращения представлены ниже.



Ниже приводится подробное описание методики определения аскорбиновой кислоты, которая может быть применена к большинству растительных и животных тканей. При анализировании окрашенных объектов или объектов, содержащих заметные количества обратимо-окисляемой формы аскорбиновой кислоты (обычно объекты, подвергавшиеся гой или иной переработке), следует применять ртуть-сероводородный метод В. И. Букина [1] или свинцово-сероводородный метод В. М. Иосиковой [2].

Первый метод является более точным по сравнению с методом Девятинина, и вытяжки, поступающие на титрование, всегда совершенно бесцветны и прозрачны. Метод Девятинина имеет преимущество перед ртуть-сероводородным в том, что не применяются ядовитые вещества (сулема и уксусно-кислая ртуть), но вытяжки бывают иногда не полностью обесцвечены и всегда имеют побочную опалесценцию.

Необходимые реактивы

1) 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. Навеску 0,3 г 2,6-дихлорфенолиндофенола растворяют в 700 мл дистиллированной воды с добавлением 1—2 капель 0,1 н. NaOH, сильно взбивают и оставляют на 1—2 часа (лучше на ночь), встраивая время от времени. Затем фильтруют и доводят объем до 1 литра. Раствор может быть использован в течение первых 7—14 дней при хранении в темноте и на ходу.

2) 1%-ная серная кислота (23 мл концентрированной H₂SO₄ с удельным весом 1,19 доводят дистиллированной водой до 1 л).

3) 2%-ная метаfosфорная кислота (20 г кристаллической HPO₄ растворяют и доводят водой до 1 л).

4) 2%-ная серная кислота (11,4 мл концентрированной H₂SO₄ с удельным весом 1,84 доводят до 1 л).

5) Аскорбиновая кислота — кристаллическая.

6) 0,001 н. раствор подати калия (KJ₀₃). Отвешивают на аналитических весах 0,3568 г подати, предварительно высушенного в течение 2 часов при 104°. Растворяют в воде и доводят объем до 1 л. Такой раствор является 0,01 н. В день определения титра его разбавляют в 10 раз, для чего берут 10 мл исходного раствора и доводят в мерной колбе до 100 мл дистиллированной водой. Исходный раствор устойчив в течение несколькиx месяцев при хранении в темноте.

7) Иодистый калий кристаллический (KJ).

8) 1%-ный раствор растворимого бражмала.

Навеску материала, величина которой обусловливается содержанием аскорбиновой кислоты в исследуемом объекте, заливают небольшим количеством 1%-ной HCl так, чтобы вся навеска была покрыта кислотой. Навеску берут из расчета, чтобы в 5 мл предназначенной для титрования вытяжки содержалось 0,15—0,20 мг аскорбиновой кислоты. При взятии навески следует избегать измельчающих приспособлений из железа и меди. Навеску тщательно растирают с кварцевым песком в фарфоровой ступке. Добавляют соляную кислоту и навеску переносят в мерную колбу на 100 мл. Затем в колбу добавляют 2%-ную метаfosфорную кислоту из расчета 1/3 от общего объема и доводят до метки 1%-ной HCl. Метаfosфорную кислоту добавляют для удаления белков и облегчения фильтрования (для животных тканей следует применять 20%-ную трихлоруксусную кислоту в тех же соотношениях).

2. Разделение эргостерина и холестерина. Эргостерин отделяется от других стеринов при восходящем способе хроматографирования с 72%- или 78%-ным этиловым спиртом или 90%-ным метиловым спиртом. Бумагу пропитывают

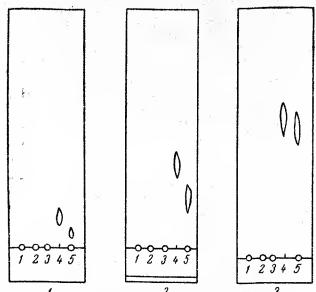


Рис. 3. Хроматограммы отделения витамина D от других стеринов.

(Умножено в 5 раз)
1—восходящая; подвижная фаза — 72%-ный метиловый спирт.
Бумага пропитана 1%-ным раствором парафина в хлороформе.
Продолжительность хроматографирования — 15 час. при $t = 22^\circ$.
2—восходящая; подвижная фаза — 85%-ный метиловый спирт.
Бумага пропитана 2% раствором KNaPO_4 . Продолжительность хроматографирования — 15 час. при $t = 22^\circ$.
3—восходящая; подвижная фаза — 80%-ный метиловый спирт. Бумага ацетилирована. Продолжительность хроматографирования — 15 час. при $t = 20^\circ$.

1%-ным раствором парафина без предварительной ее обработки соляной кислотой (рис. 2, 1, 2, 3). Полного отделения эргостерина достигают при употреблении 78%-ного этилового спирта на бумаге, пропитанной водным 2M раствором KNaPO_4 (рис. 2, 4).

Хроматограммы на рис. 2, 1, 2, 3, 4 показывают, что эргостерин не продвигается по бумаге, остается в точке нанесения, а все остальные стерины продвигаются по ней далеко по фронту с R_f , близким к единице.

3. Отделение витамина D от других стеринов. Для отделения витамина D подобраны условия, при которых по бумаге продвигается только витамин D, а остальные стерины остаются в точке их нанесения (хроматограммы на рис. 3, 1, 2, 3).

Хроматограмма на рис. 3, 1 получена при употреблении 72%-ного метилового спирта на бумаге, пропитанной 1%-ным парафином, без предварительного отмывания ее водой. Для витамина D за 15 час. при восходящем способе при $22^\circ R_f = 0,3$, остальные стерины совсем не продвигаются.

Хроматограмма на рис. 3, 2 получена при использовании бумаги, пропитанной 2M KNaPO_4 с 85%-ным метиловым спиртом. При восходящем способе за 15 час. при 20° витамин D продвигается с $R_f = 0,68$, в то время как остальные стерины остаются на месте.

Хроматограмма на рис. 3, 3 получена с 80%-ным метиловым спиртом при восходящем методе на ацетилированной бумаге. Для витамина D за 15 час. при $20^\circ R_f = 0,63$. Остальные стерины остаются в точке нанесения.

П р и м е ч а н и е. Хроматограмму после подвижной фазы, состоящей из водного спирта, особенно 72%-ного метилового или этилового спирта, следует тщательно просушивать при комнатной температуре. При проявлении недосушенной хроматограммы следы влаги гидролизуют треххлористую сурьму, отчего витамин D может проявляться слабо или не проявляться совсем, если в исследуемом материале он присутствует в количестве, не превышающем 5 $\mu\text{г}$.

II. Разделение стеринов в экстрактах из различных продуктов

Применение вышеописанных условий хроматографирования для определения витамина D и стеринов показало, что определение витамина D в образцах, содержащих мало витамина (100—300 инт. ед. в 1 г) и много стеринов (больше 2 мг на 1 г), невозможно. В этих условиях в пробе, применяемой для нанесения обычного пятна, присутствует такое незначительное количество витамина D, которое не проявляется. Нанесение большего количества раствора (0,1 м вместо 0,005 мл) с целью надежного обнаружения витамина D (не менее 300—400 инт. ед.) ведет к тому, что стерины ввиду больших концентраций в этом случае не разделяются и идут сплошной полосой.

Отделение стеринов от витамина D хорошо достигается вымораживанием в метиловом спирте. Если требуется определить только витамин D, можно не отфильтровывать выпавшие стерини и отбирать пробу микропипеткой, у которой нижний конец обернут маленьким кусочком ваты. Для разделения стеринов их осадок в метиловом спирте отфильтровывают на микроворонке, вымораживание повторяют из мельчайшего

— витамин D_2 и в точке 5 — смесь указанных веществ. Хроматограммы получены за 17–22 часа при температуре 20–22° (табл. 2).

Появленная хроматограмма быстро подсыхала, пятна стеринов становились грязно-синими, а бумага, разведенная соляной кислотой, образовавшейся в процессе гидролиза треххлористой сурьмы, рассыпалась при первом прикосновении. Поэтому для каждой хроматограммы вели записи условий и результатов разделения стеринов с тем, чтобы по записи можно было изобразить хроматограмму. В табл. 2 приведен пример такой записи. По этой записи составлена хроматограмма, приведенная на рис. 1, 1.

Таблица 2

Разделение некоторых стеринов на бумаге, пропитанной 1%-ным раствором парафина в хлороформе, при высаждением способе

Наименование вещества, нанесенных на бумагу	Нанесено вещества		Условия хроматографирования	Продвижение по фронту в см	R_f	Длина пятна в см
	в мл	в г				
Смесь:	0,025	100	20			
эргостерин . . .	0,005	20			0	0,5
холестерин . . .	0,01	40			0	0,5
7-дегидрохолестерин . . .	0,005	20	87%-ный метиловый спирт	При стекании растворителя длина линии фронта	21,5 40,5	0,43 0,81
витамин D_2 . . .	0,005	20			4	7
Стероиды, нанесенные отдельно:						
эргостерин . . .	0,005	20	20	22		
холестерин . . .	0,01	40	20	22		
7-дегидрохолестерин . . .	0,005	20	20	22		
стерин . . .	0,005	20	20	22		
витамин D_2 . . .	0,005	20	20	22		

Как видно из табл. 2 и хроматограмм, приведенных на рис. 1 (рис. 1, 1—5), эргостерин и холестерин остаются в точке нанесения, 7-дегидрохолестерин и витамин D_2 продвигаются по фронту с разницей в R_f , позволяющей осуществить их разделение.

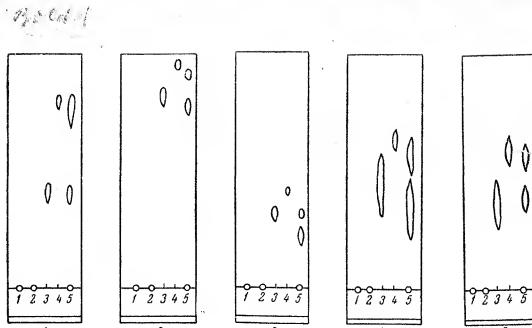


Рис. 1. Хроматограммы разделения некоторых стеринов на бумаге, пропитанной раствором парафина в хлороформе.
(Умножено в 5 раз)

1 — 1%-ным; 2 — 2%-ным; 3 — 3%-ным; 4 — 1/2%-ным раствором вазелина в хлороформе; 5 — 2%-ным раствором кастронового масла в хлороформе.

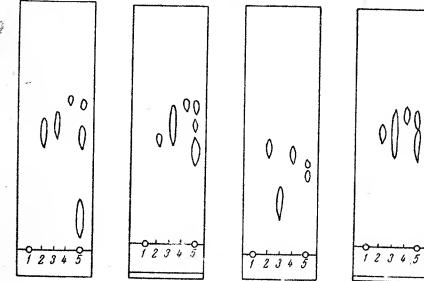


Рис. 2. Хроматограммы отделения эргостерина от других стеринов на бумаге, пропитанной 1%-ным раствором парафина в хлороформе (1, 2, 3.) и 2M KNO_3 .
(Умножено в 5 раз)

1 — высходящая хроматографическая фаза — 75%-ный этиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 20 часов при 20°; 2 — высходящая хроматографическая фаза — 75%-ный этиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 20 часов при 24°; 3 — высходящая хроматографическая фаза — 90%-ный метиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 20 часов при 1 10°; 4 — высходящая хроматографическая фаза — 90%-ный метиловый спирт. Продолжительность хроматографирования — 7 час. при 1 20°.

качества хроматографической бумаги, так и при изучении подвижной фазы по ширине полоски бумаги в 14 см наносят капли в четырех-пяти точках; в трех-четырех точках наносят растворы чистых стеринов и витаминов, и в одной точке — смесь тех же веществ. Капли наносят микропипеткой (по 0,005 мл в каждую точку с содержанием в этом объеме 20 мг растворенного вещества), а для точки со смесью — по 0,005 мл той же растворов с общим содержанием растворенных веществ 80—100 мг. После высыхивания нанесенных растворов при комнатной температуре в высушивания нанесенных растворов при комнатной температуре в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителя, матографическую камеру, насыщенную парами растворителя, налитого в небольшом количестве на дно камеры. Через 30—40 мин. лист бумаги при восходящей хроматограмме опускают в растворитель на глубину 1—1,5 см тем концом, на который нанесены исследуемые растворы. При восходящей хроматограмме лодочку, в которую помещен конец бумаги с нанесенными исследуемыми растворами, заливают растворителем. Камеру плотно закрывают крышкой с притертными краями, смазанными вазелином, и отмечают время начала хроматографирования. После того как растворитель прошел большую часть длины листа бумаги или хроматограмма выдерживалась определенное число часов и растворитель достиг конца листа, бумагу вынимают, отмечают время конца хроматографирования и высушивают ее при комнатной температуре.

П р и м е ч а н и е. Удобно пользоваться как при сушке хроматограммы, так и при нанесении пятен настольным вентилятором.

Произведение хроматограммы. Растворяют 50 г треххлористой сурьмы в 50 мл отмытого сухого хлороформа при слабом нагревании на песчаной бане и тут же 30—40 мл горячего, доведенного почти до кипения, раствора наливают в эмалированную или корамиковую кювету. Для проявления полоску бумаги опускают в слой раствора треххлористой сурьмы концом, где нанесены пятна стеринов, и, не выпуская из рук концов бумаги, проводят ее в растворе реактива всей длиной листа, пока прошла подвижная фаза. Проявленные пятна тут же обводят простым мягким карандашом, так как окрашенные пятна, в течение 1—2 час. спачала приобретают фиолетовую окраску, а затем выцветают.

Только что проявленные пятна стеринов сильно различаются по окраске. Пятна эргостерина окрашиваются в золото-фиолетовый цвет, холестерина и 7-дегидрохолестерина — в розовый, витамина D₂ — в ярко лимонный и витамина D₃ — в розово-фиолетовый цвет.

После добавления хлористого ацетата к хлороформенному раствору треххлористой сурьмы окраска пятен стеринов изменяется. Пятна эргостерина и холестерина окрашиваются в розовый цвет, 7-дегидрохолестерина — в розово-фиолетовый и витамина D₂ и D₃ — в яркооранжевый. Это различие в окраске пятен дает возможность определить 7-дегидрохолестерин и витамины D₂ и D₃ в подвижных фазах несмотря на то, что разница в величинах их R_f не превышает 10 %. Минимальные количества, которые могут быть обнаружены с данным проявителем (50%-ный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе), равны 5—10 мг для эргостерина и 7-дегидрохолестерина, 5 мг — для витаминов D₂ и D₃ и 20 мг — для холестерина.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАЗДЕЛЕНИЯ ПРОВИТАМИНОВ И ВИТАМИНОВ D ПУТЕМ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ НА БУМАГЕ

Все полученные нами данные изложены ниже в следующем порядке.

I. Разделение смеси, составленной из чистых стеринов.

II. Разделение стеринов в экстрактах из различных продуктов (жира, сыворотка крови и др.).

III. Количественное определение витаминов группы D в экстрактах омыленных жиров и других объектах.

IV. Разделение витаминов D₂ и D₃ при их совместном присутствии в экстрактах.

I. Разделение смеси, составленной из чистых стеринов

1. Разделение эргостерина и 7-дегидрохолестерина. Близкое сходство в строении стеринов, как указывалось выше, затрудняет разделение их смесей на хроматографической бумаге. Смесь, состоящую из нескольких стеринов, можно разделить только при условии применения нескольких хроматограмм. Полное разделение провитаминов достигается на исходящей хроматограмме с применением в качестве подвижной фазы 87%-ного метилового спирта. Бумага должна быть отмыта 10%-ным раствором HCl и пропита 1—3%-ным раствором парафина в хлороформе или 2%-ным кастроровым маслом. Более четкие и небольшие пятна стеринов получаются на бумаге, пропитанной 3%-ным раствором парафина (рис. 1, 2, 3, 4 и 5). На всех хроматограммах в точке 1 попадают эргостерин, в точке 2 — холестерин, в точке 3 — 7-дегидрохолестерин, в точке

отфильтровывают; фильтрат проверяют на отсутствие следов PbS и его объем доводят до 1 л.

Раствор цистина. 4 г l-цистина суспенцируют в 50 мл горячей воды, прибавляют по каплям концентрированную соляную кислоту до полного растворения цистина, доводят объем до 1 л водой.

Раствор неорганических солей готовят в двух отдельных колбах. Раствор А содержит в 250 мл 25 г K₂HPO₄, 25 г K₂PO₄; раствор Б содержит в 250 мл 0,5 г MgSO₄, 0,5 г NaCl, 0,5 г FeSO₄ и 0,5 г MnSO₄.

Для приготовления основной среды для пробирок ингредиенты берутся в следующих соотношениях: глюкозы — 5 г; раствора цептока — 50 мл; раствора цистина — 12,5 мл; дрожжевого экстракта — 10 мл; раствора солей А — 2,5 мл; раствора солей Б — 2,5 мл; pH среды доводят 1 н. NaOH до 6,6—6,8 и объем смеси доводят до 250 мл. Концентрация полученной среды в 2 раза выше концентрации среды, на которую производят посев. Нужную концентрацию среды получают добавлением используемых вытяжек или воды.

Стандартный раствор рибофлавина (40 μg в 1 мл) — тот же, что и при химических определениях; его разводят водой так, чтобы конечная концентрация раствора была равна 0,1 μg в 1 мл.

Рабочий раствор готовят каждый раз перед постановкой опыта.

Подготовка образцов

Для определения рибофлавина в трех образцах необходимо иметь 45 обычных химических пробирок. Во все пробирки вносят по 5 мл основной среды. 16 пробирок служат для получения стандартной кривой; для этого в две пробирки добавляют по 5 мл воды (нулевая проба); в следующие пробирки вносят возрастающие количества рабочего раствора рибофлавина: 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3 и 5 мл. Во всех пробирках объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации рибофлавина берут две пробирки. Таким образом получают стандартный ряд пробирок с концентрацией рибофлавина в 0,0; 0,005; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03 и 0,05 μg на 1 мл.

Для опытного образца берут 10 пробирок и также вносят все возрастающие количества растительной вытяжки: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл. Объем жидкости доводят водой до 10 мл. Для каждой концентрации берут по две пробирки.

Все пробирки стерилизуют в автоклаве в течение 15—20 мин. при 1 атм и охлаждают до комнатной температуры. Затем в каждую пробирку вносят по 2 капли посевного материала, приготовленного, как указывалось выше, и помещают пробирки в терmostat при 37° на 48 часов. После этого содержимое каждой пробирки выливают в колбочки, пробирку несколько раз

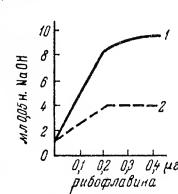


Рис. 1. Образование молочной кислоты при различных сроках выращивания культуры *Lactobacillus casei* — 48 часов (1) и 24 часа (2)

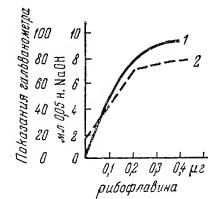


Рис. 2. Стандартные кривые для рибофлавина, полученные титрованием молочной кислоты (1) и определением мутности (2)

промывают водой, которую сливают в ту же колбочку, и обрабатывают разбавленной молочной кислотой 0,1 н. NaOH с бромомолблau в качестве индикатора.

Очень важно до начала опыта тщательно установить необходимую величину pH основной среды и используемых вытяжек, иначе могут быть получены неправильные результаты. Обычно на титрование нулевой пробы должно пойти не более 1,0—1,5 мл 0,1 н. NaOH. На титрование пробирок с высшими концентрациями рибофлавина (0,025—0,03 μg) должно быть использовано около 10—12 мл NaOH (рис. 1). Результаты титрования параллельных проб не должны расходиться больше чем на 0,2 мл. По данным титрования опытных пробирок находят содержание в них рибофлавина путем простой интерполяции стандартной кривой. Результаты, выходящие за пределы стандартной кривой (0,005 и 0,025 μg на 1 мл), отбрасываются; полученные величины сравнивают для того, чтобы убедиться, сходятся ли они при различных разбавлениях используемого образца. Если максимум отклонений не превосходит 20%, из всех величин выводят среднее. Для получения

Как видно, начальные стадии приготовления вытяжек совпадают со способом приготовления вытяжек для флуорометрического метода определения рибофлавина. Но при микробиологическом способе определения нет необходимости подвергать материал фосфатазному гидролизу, так как микроорганизмы способны усваивать как свободный рибофлавин, так и моногликозидные его формы.

В табл. 1 приведено сопоставление данных микробиологических и флуорометрических определений.

Таблица 1

Сопоставление микробиологических и флуорометрических определений рибофлавина (μг на 1 г естественно влажного материала)

Объект исследования	Содержание непрочно связанного с белком рибофлавина при определении			Содержание общего рибофлавина при определении		
	химическим методом (I)		II в % от I	химическим методом (I)		II в % от I
	микробиологическим методом (II)			химическим методом (I)	микробиологическим методом (II)	
Мясо	1,5	1,7	113	2,94	3,10	105
Щечень	37,0	40,0	108	39,0	42,0	108
Горох	2,35	2,5	106	4,53	4,69	103
Фасоль } семена	0,56	0,61	109	1,35	1,59	117
Пшеница (зерно)	1,85	2,10	113	3,55	4,00	113
Капуста цветная	0,84	0,87	103	1,46	1,63	111
Картофель (клубни)	0,4	0,4	100	0,82	0,82	100
Дрожжи	31,0	31,0	100	33,0	35,0	106

Как видно из приведенных в таблице данных, результаты определения рибофлавина обоими методами хорошо совпадают.

Ниже мы приводим описание микробиологического метода, уже не останавливаюсь на вопросах приготовления образцов, указывая лишь необходимые для этого реактивы:

1) Фосфатный буфер (pH 7,8–8,0); приготовляют 1/15 М раствор $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, т. е. 11,876 г в 1 л, и 1/15 М раствор KH_2PO_4 , т. е. 9,078 г в 1 л; на 95 частей первого раствора берут 5 частей второго и pH буферной смеси проверяют по универсальному индикатору.

2) 0,1 н. раствор серной кислоты.

3) Препараты протеолитических ферментов: трипсин, панкреатин или клараза.

Основную культуру *L. casei* выращивают на агаровой среде, которую готовят следующим образом: 3 г агар-агара растворяют в 100 мл горячей воды, добавляют 1 г глюкозы и 4 мл дрожжевого экстракта (приготовление дрожжевого экстракта см. ниже). Смесь доводят до 200 мл и разливают в пробирки по 10 мл в горячем виде. Пробирки закрывают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при двух атмосферах в течение 20 мин. Пересев культуры производят еженедельно. Пробирки с культурой выдерживают 24–36 час. в термостате при 37°, затем переносят в холодильник, где они могут сохраняться длительное время.

Посевной материал получают из 24–36-часовой культуры на основной среде с 1 μг рибофлавина после центрифугирования или декантации, и перенесения бактериальных клеток в 10 мл стерильного 0,9%-ного раствора NaCl . Эту солевую суспензию используют для засева опытных пробирок. Исходную культуру посевного материала используют лишь один раз. Все манипуляции проводят строго асептически.

Основная среда, на которой выращивается как посевной материал, так и культура в испытуемых пробирках, состоит из следующих компонентов: пентона, глюкозы, уксусно-кислого натрия, цистиша, дрожжевого экстракта и неорганических солей.

Пентон используется безводный, химически чистый.

Пентон подвергают для разрушения следом рибофлавина на щелочному фотолизу. Для этого к раствору пентона (60 г в 250 мл) прибавляют раствор NaOH (20 г в 250 мл), хорошо перемешивают и переносят в кристаллизатор диаметром 25 см. Кристаллизатор помещают под электролампу в 200 W на расстоянии от нее 0,5 м на 6 час. Температура раствора не должна превышать 25°. Смеси оставляют на 24 часа, после чего pH раствора доводят до 6,6–6,8, прибавляя 27–90 мл ледяной уксусной кислоты; вносят 7 г уксусно-кислого натрия и объем раствора доводят до 800 мл. Такой раствор содержит 5% пентона и 6% уксусно-кислого натрия.

Дрожжевой экстракт, 100 г автоклавированного дрожжа размешивают в 500 мл воды, прибавляют 150 г уксусно-кислого свинца, разведенного в 500 мл воды. К смеси прибавляют раствор аммиака до pH 10. Образующийся осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера, фильтрат подкисляют по ледяной уксусной кислотой до слабокислой реакции по лакмусу и избыток свинца удаляют сероводородом. PbS

физность, присущую биологическим методам. Но сравнению с химическими методами его достоинством является то, что он может применяться и в тех случаях, когда еще неизвестна химическая природа исследуемых веществ, что невозможно для химических методов. Но даже и при возможности применения химических методов, микробиологический метод иногда предпочтительнее химических благодаря большей специфичности и простоте.

Существенным недостатком микробиологического метода является то, что в испытуемых природных материалах, а еще чаще в продуктах их гидролиза, получаемых во время подготовки образцов к анализу, нередко присутствуют вещества, которые могут стимулировать или угнетать рост микроорганизмов вне зависимости от содержания определяемого соединения. С другой стороны, гидролизат могут переходить не все связанные формы витамина, и в этом случае данные микробиологических определений будут занижены по сравнению с результатами биологических методов.

Рибофлавин является одним из первых витаминов, в отношении которого был разработан микробиологический метод. В сводной статье Снелл [1] приводится подробное описание метода определения рибофлавина при использовании целого ряда микроорганизмов как обычным путем, так и ультрамикрометодом. Следует сказать, что основная среда, на которой выращивают молочнокислые бактерии, в случае определения рибофлавина значительно проще по своему составу, чем для многих других витаминов.

Разрабатывая микробиологический метод определения рибофлавина, мы остановились на методе Снелла с применением молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei*. При наложении метода нам пришлось внести некоторые изменения в предложенную этим автором пропись, что было нами освещено в ранее опубликованной работе [2].

В последнее время мы уделили большое внимание вопросу усовершенствования методики приготовления образцов для анализа, что было вызвано установлением существования прочной связанный с белком формы рибофлавина [3].

Как указывалось выше, недостатком микробиологического метода определения витаминов является то, что микроорганизм получает в качестве питательной среды приготовленную тем или иным способом сильно разбавленную вытяжку. Этим и объясняется тот факт, что несмотря на наличие в разных объектах прочной связанный формы рибофлавина, посредством мик-

робиологического метода она не могла быть обнаружена, так же как и путем применения химического метода.

В настоящее время мы разработали два способа приготовления исследуемых образцов: первый способ дает возможность определить общее содержание рибофлавина, а второй — лишь содержание свободного и легко отщепляемого мононуклеотидного и динуклеотидного рибофлавина. Разность между этими определениями характеризует содержание вновь обнаруженной прочной связанный с белком формой рибофлавина*.

Приготовление образца для определения общего содержания рибофлавина

Навеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера (рН 7,8—8,0). Растворенную массу переносят в колбу с добавлением того же буферного раствора таким образом, чтобы общее разведение было около 1 : 15 или 1 : 20, и смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., затем охлаждают до 30°, проверяют значение рН и, в случае сдвигта в кислую зону, снова доводят до 7,8—8,0. К смеси добавляют ферментный препарат (трипсин, панкреатин или кларазу) из расчета 30 мг на 1 г сухого вещества и помешают ее в терmostat при 37° на 12—16 часов. Затем рН смеси доводят до 5,5—6,0 разбавляют ее так, чтобы разведение равнялось 1 : 25 или 1 : 30. Вытяжку фильтруют через складчатый фильтр, фильтрат разбавляют до содержания в 1 мл около 0,1 мг рибофлавина.

Приготовление образца для определения свободного, моно- и динуклеотидного рибофлавина

Для определения этих форм рибофлавина павеску материала тщательно растирают в ступке с небольшим количеством 0,1 н. H_2SO_4 и переносят в колбу, куда добавляют 0,1 н. H_2SO_4 до общего разведения 1 : 15 или 1 : 20. Смесь выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 мин., охлаждают, рН вытяжки доводят до 5,5—6,0, объем доводят до общего разведения 1 : 25 или 1 : 30, смесь фильтруют через складчатый фильтр и фильтрат снова разводят до содержания 0,1 мг рибофлавина в 1 мл.

* Подробнее о соотношениях различных форм рибофлавина см. нашу статью в этом же сборнике «Флуориметрический метод определения рибофлавина».

связанного с белком рибофлавина. Эти цифры показывают, в каких объектах присутствует вновь обнаруженная форма и насколько больше общее содержание рибофлавина по сравнению с тем, которое определяется по применявшимся ранее методам (табл. 2).

Приведенные данные показывают, что у целого ряда исследованных образцов прочно связанный с белком рибофлавин присутствует в очень больших количествах, достигающих содержания суммы всех остальных его форм. К таким объектам относятся почти все растительные продукты (картофель, овощи, зерновые). Консервы из овощей также содержат некоторое количество этой формы. Из животных объектов вновь обнаруженная форма присутствует в мышцах, значительно меньше ее в печени, в почках она отсутствует.

Дрожжи и низшие грибы не содержат прочно связанный с белком формы рибофлавина.

Следует учитывать, что содержание рибофлавина в исследованных объектах колеблется в зависимости от различных условий произрастания, хранения и т. д., поэтому приведенные данные показывают лишь те пределы, в которых рибофлавин присутствует в тех или иных продуктах.

Л и т е р а т у р а

1. Warburg O. u. Christian W. Über das gelbe Ferment und seine Wirkung.—Bioch. Z., 254, 438, 1932; 266, 377, 1933.
2. Половецкая К. Л. О новой связанной с белком форме рибофлавина.—Биохимия, 18, 636, 1953.
3. Besssey O. A., Lowry O. H., Love R. H. The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues.—J. biol. chem., 180, 756, 1949.
4. Половецкая К. Л. и Скоробогатова Е. П. Сопоставление химического и микробиологического методов определения рибофлавина в растительном материале.—Биохимия, 18, 79, 1953.
5. Труфачев А. В. и Кирсанова В. А. Рибофлавин и аневризм при артритах дрожжей.—Биохимия, 5, 234, 1940.

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР

К. Л. ПОЛОВЕЦКАЯ, Е. П. СКОРОБОГАТОВА
и Н. И. ЗАЙЦЕВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА

Микробиологический метод количественного определения витаминов получает все более широкое распространение. Принцип метода основан на том наблюдении, что для роста ряда микроорганизмов необходимо присутствие в среде тех или иных витаминов. Используя основную среду, дополненную во всех отношениях за исключением используемого вещества, к этой среде добавляют в одной серии проб низкотравящие количества недостающего витамина, а в параллельной серии — возрастающие количества вытяжки из испытуемого образца и на основе сопоставления ростового эффекта в двух сериях опыта вычисляют содержание интересующего вещества и аналигирующих материалов.

В качестве микроорганизмов используются различные бактерии, дрожжи и плесневые грибы. Молочнокислые бактерии являются особенно подходящими для этой цели вследствие того, что среди них найдены штаммы, нуждающиеся в самых разнообразных витаминах. Они легко растут на синтетических и полусинтетических средах, не требуют специальной аэрации и не являются патогенными.

Ростовой эффект может быть определен по низкотраванию числа клеток путем прямого подсчета или по мутности среды, а также по определению образующихся продуктов обмена, например, в случае молочнокислых бактерий путем титрования молочной кислоты.

Микробиологический метод имеет существенные преимущества по сравнению с биологическими методами определения на животных в отношении быстроты, малой затраты труда и материалов, сохраняя в то же время в значительной мере специ-

Ингредиенты вводят в указанной последовательности в колбу с 500–600 мл дистиллированной воды, перемешивают каждый раз. Затем доводят водой почти до одного литра, подщелачивают 5 н. NaOH до pH 6,8 и добавляют воду точно до литра.

V. Выращивание исходной культуры *Streptococcus faecalis*

К 90 мл дистиллированной воды добавляют 10 мл дрожжевого аутоплазата*, 1 г глюкозы и 1,5–2 г агар-агара. Гарячую смесь в водной бане до растворения агара, разливают по пробиркам еще горячим раствором, закрывают пробками с ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при давлении, равном 1 атм., в течение 15 минут, охлаждают в наименее возможных положениях. Засевают не менее 2–3 пробирок из культуры *Streptococcus faecalis*. После выдерживания в аэраторе в термостате в течение 16–24 час. при 37° их переносят в ходильник, где и сохраняют. Таким образом получают исходный штамм культуры микроорганизма. Способом из этой исходной культуры готовят не менее одного раза в чистоте.

VI. Приготовление стандартного раствора фолиевой кислоты

Основной раствор фолиевой кислоты (100 мкг/мл) готовят растворением 10 мг чистой фолиевой кислоты (не содержащей флуоресцирующих примесей) в дистиллированной воде с добавлением 1–2 капель 5 н. NaOH и доведением объема в мерной колбе до 100 мл. Раствор хранят в ходильнике под слоем толуола. Затем делают дальнейшие разведения: берут 1 мл основного раствора, переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят водой до метки. Этот раствор, содержащий в 1 мл 1 мкг, можно хранить в ходильнике под слоем толуола не более одного месяца. В день опыта 2 мл последнего раствора доводят в мерной колбе до 100 мл дистиллированной водой. Отсюда берут 10 мл и снова доводят до 100 мл в мерной колбе. В 1 мл этого раствора содержится 0,002 мкг фолиевой кислоты, его используют для получения стандартной кривой (стандартный раствор фолиевой кислоты).

* Приготовление см. на стр. 140. Полученный дрожжевой аутоплазат разливают по пробиркам и стерилизуют при давлении, равном 1 атм., в течение 15 минут.

VII. Приготовление культуральной среды

В пробирки вносят по 5 мл основной среды, по 5 мл стандартного раствора фолиевой кислоты (1 мл содержит 0,002 мкг фолиевой кислоты) и стерилизуют в течение 15 мин. при давлении, равном одной атмосфере.

VIII. Приготовление посевного материала

За сутки до постановки опыта пробирки с культуральной средой (обычно две-три) засевают культурой *Streptococcus faecalis* и ставят в термостат на 20–24 часа при 37°. Затем бактериальнуюlawax засевают асптическими иглами в стерильные центрифужные пробирки и центрифugируют в течение 10–15 минут. Жидкость сливают, а осадок промывают 10 мл стерильного 0,9%-ного раствора NaCl, отфильтровывают центрифугированием и снова суспендируют в 20 мл 0,9%-ного стерильного раствора NaCl.

IX. Постановка опыта

1. Приготовление пробирок для стандартной кривой.

Берут 24 пробирки одинакового размера (наиболее удобным размером является 18×140 мм).

Первые три пробирки оставляют пустыми, во вторые три пробирки вносят по 0,5 мл стандартного раствора фолиевой кислоты, т. е. по 0,001 мкг, в третьи — по 1 мл раствора, т. е. по 0,002 мкг, в четвертые — по 1,5 мл, т. е. по 0,003 мг фолиевой кислоты, и так далее. В последние пробирки вносят по 4 мл раствора фолиевой кислоты. Во все пробирки засевают по 5 мл основной среды и до 10 мл дополняют дистиллированной водой, т. е. в первые три пробирки вносят по 5 мл воды, во вторые — по 4,5 и так далее.

2. Приготовление пробирок с испытуемым раствором.

Для каждого образца берут 10 пробирок. В первые две параллельные пробирки наливают по 0,5 мл испытуемого раствора, во вторые — по 1 мл, в третьи — по 1,5 мл, в четвертые — по 4 мл и пятые — по 5 мл. В каждую пробирку прибавляют по 5 мл основной среды и доводят до 10 мл дистиллированной водой.

Все пробирки закрывают ватными пробками и автоклавируют прямо в штативах при давлении, равном 1 атм., в течение 15 минут. После охлаждения каждую пробирку засевают одной каплей посевного материала и оставляют в термостате при 37° на 40–48 часов.

в автоклаве при давлении, равном 1 атм., в течение 20 мин. или сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

2. Казениновый ферментативный гидролизат. 50 г измельченного казеина растворяют в 800 мл 0,8%-ного Na_2CO_3 . К полученной гомогенной суспензии добавляют 250 мг панкреатина (или трипсина). Смесь покрывают тонким слоем толуола и помешают на 48 ч. в термостат при 37°. Затем смесь прогревают текучим паром в автоклаве в течение 20 минут. После охлаждения pH гидролизата доводят ледяной уксусной кислотой до 6 и фильтруют с отсасыванием. Раствор ветвятся в течение 30 мин. с 30% активированного угля, фильтруют и после доведения pH до 3,8 еще раз ветвятся с 12% угля. Каждый раз фильтры промывают небольшими порциями воды и промывные воды присоединяют к фильтрату.

Объем гидролизата доводят до 1 л, разливают его в колбы по 50—100 мл и стерилизуют в автоклаве при одной атмосфере в течение 20 мин. или же хранят в холодильнике под слоем толуола.

3. Раствор dl-триптофана. 1 г dl-триптофана растворяют в 30—40 мл 10%-ной HCl и доводят до 200 мл. Сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

4. Раствор I-цистина. 1 г I-цистина растворяют в 40 мл 10%-ной HCl и добавляют дистиллированную воду до 200 мл. Сохраняют в тех же условиях, как и раствор триптофана.

5. Раствор аденин-гуанин-урацила. Отвещивают по 0,1 г аденинсульфата, гуанин-гидрохлорида, урицила и растворяют в мерной колбе в 20%-ной HCl при длительном нагревании в кипящей водяной бане, доводят после охлаждения до 100 мл и сохраняют в холодильнике.

6. Растворы витаминов. Отвещивают по 10 мг:

- 1) тиамил-гидрохлорида,
- 2) пантотената кальция,
- 3) пиридоксина-гидрохлорида,
- 4) рибофлавина,
- 5) никотиновой кислоты,
- 6) D-аминоабензойной кислоты,

растворяют отдельно каждый витамин в дистиллированной воде и доводят до 100 мл в мерных колбах.

Рибофлавин растворяют при нагревании в кипящей бане. Растворы рибофлавина и пиридоксина необходимо сохранять в темных склянках.

Все растворы витаминов сохраняют в холодильнике под слоем толуола.

7) Раствор биотина готовят с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось 0,2 мг. Раствор разливают в пробирки и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 15 мин.

7. Раствор солей (A). Растворяют 25 г однососновного фосфорнокислого калия (KHP_2O_4) и 25 г двусосновного фосфорнокислого калия (K_2HPO_4) в 250 мл дистиллированной воды. Раствор сохраняют в холодильнике.

Раствор солей (B). Растворяют 10 г сернокислого магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,5 г хлористого натрия (NaCl), 0,5 г сернокислого железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) и 0,5 г сернокислого марганца ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Объем доводят до 250 мл. Раствор сохраняют в холодильнике.

IV. Приготовление основной питательной среды

Таблица 1

Состав основной питательной среды на 1 л

Наименование составных частей	Весовое количество	В миллилитрах исходных растворов
Глюкоза	20 г	—
Натрий уксусно-натриевый ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	33	—
Казениновый гидролизат (насыщенный)	9	90
Казениновый гидролизат ферментативный	1	20
I-цистин	0,2 г	40
dl-триптофан	0,2 г	40
Раствор солей (A)	по 0,02 г	20
Аденин, урацил, гуанин	насыщено	—
Тиамил-гидрохлорид	0,45 мл	4,5
Пантотенат кальция	0,45	4,5
Рибофлавин	0,45	4,5
Никотиновая кислота	0,1	1
D-аминоабензойная кислота	1,0	40
Пиридоксин	0,002	10
Биотин	—	10
Раствор солей (B)	1 г	—
K_2HPO_4	1	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	10
NaCl	0,02	—
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02	—
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02	—

О. И. ПУШКИНСКАЯ и Л. С. КУЦЕВА

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

При микробиологическом определении фолиевой кислоты пользуются штаммами *Lactobacillus casei* или *Streptococcus faecalis* [1, 2].

Мы пытались оба штамма и нашли, что они способны количественно определять этот витамин. *L. casei* более чувствителен, чем *S. faecalis*, что является его преимуществом, однако этот организм более требователен к составу среды и условиям выращивания, чем *S. faecalis*, и поэтому в обычной лабораторной практике менее предпочитаем.

Оба штамма микроорганизмов одинаково отзываются как на фолиевую, так и на фолиновую кислоту, поэтому обе кислоты при использовании этих штаммов определяются суммарно.

В настоящей статье дается описание микробиологического метода определения фолиевой кислоты с молочнокислой бактерией *Streptococcus faecalis*.

Микробиологический анализ распадается на следующие 11 этапов.

I. Приготовление препарата фермента конъюгазы

Навеску поджелудочной железы курицы или почки свиньи (10—20 г) измельчают (почки свиньи предварительно механически очищают от жира) и тщательно растирают в ступке с трехкратным количеством воды. Вытяжку отделяют центрифугированием и разливают в пробирку по 5—10 мл.

Раствор хранят в холодильнике в замороженном состоянии. При этом часть белков выпадает в осадок, в качестве источника фермента используется прозрачная жидкость.

II. Подготовка испытуемого образца для анализа

В связи с тем, что фолиевая кислота в исследуемых образцах находится в основном в виде конъюгатов, недоступных блокериям, необходима предварительная ферментативная обработка материала специфическими ферментами — конъюгазами. Мы пользовались ферментными препаратами из поджелудочной железы курицы, оптимум действия которых лежит при рН 7, и из почки свиньи — с оптимумом действия при рН 5.

Навеску образца (0,1—0,5 г) тщательно растирают и переносят 10 мл буферного раствора (1%-ным раствором ацетата натрия — рН 5 или фосфатным буфером — рН 7 в зависимости от применяемого фермента) в эrlenmейеровскую колбу на 50 мл. После пятиминутного кипячения в водяной бане и охлаждения раствора к нему добавляют фермент из расчета 1 мл на 20 мг сухого остатка образца, три капли толуола и смесь ставят на 24 часа в терmostat при 37°. Затем, после инактивации действия фермента пятиминутным кипячением в водяной бане и охлаждения, при помощи 0,5 н. раствора NaOH устанавливают рН смеси 6,8, а ее объем доводят дистиллированной водой до 100 мл. Раствор отфильтровывают и разводят таким образом, чтобы 1 мл содержало приблизительно 0,001 мг фолиевой кислоты. Параллельно ставят контрольный опыт для учета содержания фолиевой кислоты в ферментной вытяжке.

III. Приготовление растворов для основной среды

1. Казениновый кислотный гидролизат. 400 г казеина смешивают в литровой колбе с 500 мл 20%-ной соляной кислоты. Смесь нагревают с обратным хладильником в течение 24 часов. Первые пять—восемь часов нагревание производят в водяной бане, а затем на плите с асbestosвой сеткой. Из полученного гидролизата при пониженном давлении отгоняют HCl. К густому остатку добавляют 300 мл дистиллированной воды и снова отгоняют до густоты сиропа. Указанную операцию повторяют еще раз.

Растворяют оставшуюся массу приблизительно в 100 мл дистиллированной воды, доводят рН до 3,5 посредством 3 н. NaOH, объем доводят водой до 1 л, добавляют 20 г активированного древесного угля и ветряхивают в течение одного часа; затем фильтруют с отсасыванием. Еще раз повторяют обработку углем и получают бесцветный или слабожелтый раствор. Разливают раствор в колбы, по 100 мл в каждую, и стерилизуют

В фильтрате измеряют интенсивность флуоресценции с узанным выше светофильтром.

Интенсивность флуоресценции испытуемой вытяжки сравнивают с интенсивностью флуоресценции стандартного раствора фолиевой кислоты.

Основной раствор фолиевой кислоты готовят растворением 20 мг предварительно перекристаллизованной кислоты в 100 мл воды, слегка подщелоченной 10%-ным раствором NaOH (на 100 мл 3 капли). Раствор хранят в темной склянке под тулолом на ходу. Перед определением из него готовят стандартный раствор путем разведения 1 мл до 100 мл. Из этих 100 мл на определение берут 10 мл, pH раствора доводят до 3 и раствор обрабатывают KMnO₄ и H₂O₂ подобно опытной вытяжке. После этого pH устанавливают в пределах 4–4,5, объем раствора доводят до 20 мл, раствор фильтруют и определяют в нем флуоресценцию. В 1 мл стандартного раствора, таким образом, содержится 1 мг фолиевой кислоты.

Так как применяемые реактивы обладают некоторой флюресценцией, необходимо ставить холостой опыт, показания которого вычитают из показания опытного образца. Холостой опыт проводят по той же самой прописи, но без испытуемого материала.

Содержание фолиевой кислоты выражают в микрограммах на 1 г испытуемого материала, расчет ведут по следующей формуле:

$$X = \frac{(a_1 - a_2) \cdot R \cdot v}{a_3 \cdot P},$$

где: a_1 — показание гальванометра для испытуемого объекта;
 a_2 — показание гальванометра для холостого опыта;
 a_3 — показание гальванометра для стандартного раствора;
 R — содержание фолиевой кислоты в стандартном растворе в микрограммах на 1 мл (обычно 1 мг);
 v — конечный объем (в мл) вытяжки, флуоресценцию которой измеряют;

P — навеска материала (в г) с учетом разбавлений.

В случае высокобелковых продуктов, таких, как печень, дрожжи, бобовые продукты, оказалось, что фолиевая кислота из них полностью не извлекается указанным выше способом, поэтому необходимо дополнительное проведение ферментативной обработки.

При ферментативной обработке можно применять такадиазаз, полиферментный патентованный препарат типа «полиди-

зы» или высушенный минеральный гриб нептицидииума, как это было предложено К. Л. Новолоцкой и Е. П. Скробогатовой [12].

Техника ферментативной обработки сводится к следующему. Полученную первоначально водную вытяжку охлаждают, pH доводят до 4,5 и затем к ней добавляют 100 мг ферментативного препарата. Вытяжку с добавленным ферментом препаратом ставят в терmostат при 40–45° на ночь, после чего ее pH доводят до 3, а общий объем до 100 мл, фильтруют, для дальнейшей обработки берут 50–75 мл фильтрата. Обработку ведут так, как указано выше.

При ферментативной обработке к холостому опыту добавляют фермент.

Результаты определения фолиевой кислоты в чистых растворах при их обработке по описанному методу приведены в табл. 1. Для опытов брали 50 мл чистых растворов с общим содержанием фолиевой кислоты в пределах от 10 до 200 мг.

После обработки конечный объем элюата, используемого для определения флуоресценции, во всех случаях был равен 10 мл с концентрацией в нем фолиевой кислоты от 1 до 20 мг.

Таблица 1
Определение фолиевой кислоты в чистых растворах

Взято фолиевой кислоты в мг	Найдено при определении	
	в мг	в % от конечного количества
1	1,0	100
2	2,0	100
3	2,8	93,3
5	4,0	80
10	8,0	80
20	14,5	72,5

Из таблицы видно, что небольшие количества фолиевой кислоты (1–3 мг) определяются полностью, при более высоком ее содержании наблюдались потери, доходившие до 20–25% исходного количества.

ниям с потерей при его восстановлении флуоресценции и обратном ее появлении при окислении.

Максимумы абсорбции фолиевой кислоты в 0,1 н. NaOH лежат при 257, 282 и 365 мк. Соответствующие коэффициенты поглощения $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ равны 585, 570 и 206.

Специфическим симптомом недостатка фолиевой кислоты в организмах человека и животных является нарушение функций кроветворения, выражющееся в развитии анемии, лейкоцитоза, цитоидии, т. е. в уменьшении красных и белых клеток крови и задержке в созревании форменных элементов крови. Сопровождающие признаки — задержка в росте организма, снижение его веса и ряд побочных признаков. Установление кроветворной функции фолиевой кислоты в опытах на животных послужило основанием для терапевтического ее применения.

Значение фолиевой кислоты определяется не только ее центральным физиологическим действием при лечении и предупреждении анемии у человека, но и большим ее значением для сельскохозяйственных животных. Она необходима также микроорганизмам, например, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* и др.

До недавнего времени существовал только микробиологический способ определения фолиевой кислоты с использованием в качестве индикаторных микроорганизмов *Lactobacillus casei* и *Streptococcus faecalis* (см. статью Пушкиной и Кунцовой в этом сборнике). В 1949 г. нашей лабораторией был разработан метод химического определения фолиевой кислоты [11], основанный на адсорбции ее из вытяжек активированным углем, окислении десорбированного витамина перманганатом калия с целью перевода в флуоресцирующее производное и изменения интенсивности флуоресценции в области максимума свечения (470 мк) по сравнению со стандартным раствором.

ОПИСАНИЕ ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ

Навеску материала берут с таким расчетом, чтобы в 1 мл вытяжки, назначенный для определения флуоресценции, содержалось не более 2–3 мг фолиевой кислоты. Обычно берут для этого навески дрожжей и почек — 1–2 г, зерновых продуктов — 5–10 г и овощей и фруктов — 10–20 г.

Навеску материала тщательно растирают с кварцевым песком, пересыпят в колбу, заливают 75 мл воды и выдергивают в кипящей бане в течение 45 минут. После охлаждения объем жидкости доводят до 100 мл и вытяжку фильтруют. Для дальнейшей обработки берут 50–75 мл фильтрата с точным учетом объема. Вытяжку подкисляют до pH зернной кислотой (2%), затем для адсорбции фолиевой кислоты добавляют 100 мг предварительно обработанного анилином активированного угля для уменьшения прочности адсорбции фолиевой кислоты и для облегчения ее элюции, а также для отделения многих флуоресцирующих примесей. Обработка анилином состоит в том, что уголь заливают 10-кратным количеством 10%-ного водного раствора анилина, кипятят на электрической плитке под тягой при помешивании в течение одного часа, промывают 5–6 раз дистиллированной водой, сушат при 30–40° и хранят в закрытой склянке.

Анализируемую вытяжку с добавленным углем, обработанную как указано выше, кипятят 5 минут в тех же условиях и затем уголь отфильтровывают в вакууме через фильтр Шотта № 2 или на аналогичном стеклянном фильтре отечественного производства. Десорбцию витамина проводят нагревом до кипения 3%-ным раствором аммиака в 70%-ном спирте 5 раз на том же фильтре Шотта. Уголь смывают с фильтра, переводят в колбу и вновь подвергают такому же кипячению, как и в начале, затем переносят на тот же фильтр, отфильтровывают, вновь переносят уголь в колбу и кипятят еще раз, переносят на фильтр и 3 раза промывают указанным горячим раствором приамо на фильтре. Спирт предварительно проверяют на отсутствие флуоресценции; в случае ее наличия спирт необходимо перегнать. Общее количество элюирующей смеси равняется 70 мл, из них на первую десорбцию берут 20 мл, на вторую и третью — по 15 мл, на четвертую и пятую — по 10 мл.

Соединенные порции элюатов помещают в перегонную колбу со стеклянным шипром и отгоняют примерно до объема 10–15 мл, после чего рН остатка доводят 2%-ной H₂SO₄ до 3 и вытяжку подвергают обработке 4%-ным раствором KMnO₄, который добавляют по каплям до исчезающей розовой окраски. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 10 мин., к концу которых она несколько буреет, но слабо-розовый оттенок сохраняется. После этого добавляют по каплям 3%-ную H₂O₂ для удаления избытка перманганата. Затем рН вытяжки доводят до 4–4,5, измеряют ее объем и фильтруют.

11 Витаминные препараты

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, Москва

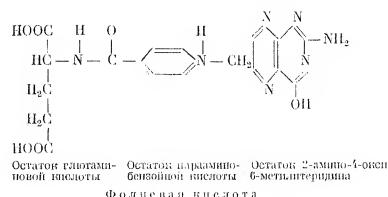
Н. А. АНДРЕЕВА

**ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ**

Фолиевая кислота, или птерониглутаминовая кислота, водорастворимый витамин, входящий в группу витамина В. Она находится во многих пищевых продуктах, особенно ее много в печени, дрожжах и зеленых листьях. Впервые фолиевая кислота была описана в 1935 г. при пищевой недостаточности у обезьян и была названа витамином «М» [1]. В 1939 г. Хоган и Паррот описали случай анемии у крыс из-за недостатка в диете какого-то неизвестного «фактора», который они назвали витамином «В₆» [2]. В 1941 г. Стокстед и его сотрудники сообщили, что этот фактор необходим при выращивании *Lactobacillus casei* и назвали его «*Lactobacillus casei* factor» [3]. В этом же году Митчелл и Смельц изолировали кристаллический компонент из щипцов и назвали его фолиевой кислотой от латинского слова *folium* — лист [4]. Последующие работы показали, что все эти вещества идентичны, их стали называть общим термином — фолиевая кислота. После выделения из печени кристаллической фолиевой кислоты Англером с сотр. в 1946 г. [5] была установлена [6] структурная формула этого вещества, и было показано, что в ней входят: 1) итеридин, 2) *l*-аминобензойная кислота и глутаминовая кислота.

Как видно из формулы, *l*-аминобензойная кислота связана своей аминной группой с итеридином в положении 6 через метиленовый мостик, а своей карбоксильной группой связана с аминной группой глутаминовой кислоты. Четыре метода синтеза этого соединения были опубликованы в 1948 г. [6, 7, 8 и 9]. Затем были так же изолированы из природных материалов вещества с тремя и семью остатками глутаминовой кислоты [10], получившие соответственно названия — птерониглутаминовая кислота и птероилсемьглутаминовая кислота.

Флуорометрический метод определения фолиевой кислоты 159



Остаток глутаминовой кислоты Остаток пиримидо-бензойной кислоты Остаток 2-амино-4-оксипропионат-6-метилптеридина
Фолиевая кислота

Чистые препараты фолиевой (птероилмоноглутаминовой) кислоты представляют собой желто-окрашенные игольчатые кристаллы, но имеющие точки плавления, состава C₁₉H₁₉O₆N₇, мол. вес 441,4. Растворимость фолиевой кислоты весьма ограничена, составляя около 100 мг% в кипящей воде и около 0,16% в воде, подкисленной до pH 3 при 25°.

Фолиевая кислота слегка растворима в ледяной уксусной кислоте, метиловом спирте, менее растворима в этиловом и бутиловом спиртах, нерастворима в ацетоне, эфире, петролейном эфире и хлороформе. Аммонийная, патриевая и бариявая соли хорошо растворимы в водных спиртах и весьма растворимы в воде.

Фолиевая кислота осаждается из водных растворов уксусно-кислым свинцом, азотокислым серебром, а также солями меди, ртути, железа, бария, цинка, фосфорновольфрамовой кислотой. Она хорошо адсорбируется активированным углем, различными сортами фуллеровой земли, бентонитом, флюоритом и другими адсорбентами. Она способна количественно десорбироваться 3—5%-ными растворами аммиака.

Выдающимся свойством фолиевой кислоты является ее способность к обратимым окислительно-восстановительным превращениям. При воздействии гидросульфида она восстанавливается с потерей желтой окраски, а при втяжении на воздухе вновь переходит в окисленную форму. Флуоресценцией сама по себе фолиевая кислота не обладает, но при воздействии таких окислителей, как перманганат, от нее отщепляется *l*-аминобензойная кислота вместе с глутаминовой и образуется итеридилсемькарбоновая кислота (или алдегид), обладающая интенсивной голубоватой флуоресценцией с максимумом синечения при 470 мкм. Это флуоресцирующее производное также способно к обратимым окислительно-восстановительным превращениям.

3. Колбочки засевают таким же количеством индикаторной культуры, как и при составлении стандартной кривой, и ставят на 40–48 час. в термостат при 27°.

4. По сухому весу культуры, собранной так же, как указано в разделе I (п. 5), устанавливают, пользуясь стандартной кривой, содержание пантотеновой кислоты в миллилитре индикаторной среды. Зная степень разведения, вычисляют количество витамина в образце.

Определение β -аланина

Если для роста *S. Ludwigi* необходима полная молекула пантотеновой кислоты, то дрожжевые культуры *Saccharomyces cerevisiae* XII и *Saccharomyces cerevisiae* «Gebrüder Meyer» довольствуются лишь β -аланином. Определение β -аланина проводят по методу, применяемому для определения пантотеновой кислоты, со следующими отличиями:

1) Индикаторными культурами служат *Saccharomyces cerevisiae* XII или *Saccharomyces cerevisiae* «Gebrüder Meyer».

2) На один литр среды Ридер добавляют витамины, необходимые для используемых индикаторных культур, в следующем количестве:

биотин	— 2 мг
витамин В ₁	— 1 мг
витамин В ₆	— 100 мг
никотиновая кислота	— 1 »
тиамин	— 3 мг

3) В колбочки с индикаторной средой добавляют вместо пантотеновой кислоты соответствующие количества β -аланина.

ВЫВОДЫ

1. Предложен микробиологический метод определения пантотеновой кислоты при помощи дрожжевого организма *Saccharomyces ludwigi* KM.

2. Индикаторная культура нуждается в получении изве биотина, витаминов В₁ и В₆, никотиновой кислоты и полной молекулы пантотеновой кислоты, которая не может быть заменена ее составными компонентами или их смесью.

3. Описываемый метод дает возможность определять от 0,001 до 0,008 мг пантотеновой кислоты в миллилитре испытуемого раствора.

4. Дрожжевой метод значительно проще и доступнее по сравнению с известными методами, в которых используются бактериальные индикаторные культуры.

5. Для определения β -аланина применяены дрожжевые культуры *Saccharomyces cerevisiae* XII и *Saccharomyces cerevisiae* «Gebrüder Meyer».

Л и т е р а т у р а

- Jukes T. H. The distribution of pantothenic acid in certain products of natural origin.—J. nutrition, 24, 193, 1944.
- Strong F. M., Feeney R. E. a. Neal A. Microbiological assay for pantothenic acid. Ind. eng. chem., Anal. ed., 13, 566, 1941.
- Neal A. L. a. Strong F. M. Microbiological determination of the pantothenic acid.—Ind. eng. chem., Anal. ed., 15, 654, 1943.
- Skeggs H. R. a. Wright L. D. The use of *Lactobacillus arabinosus* in the microbiological determination of pantothenic acid.—J. biol. chem., 156, 21, 1944.